GIDA VE YEM ÜRÜNLERİNDE GDO TESPİTİ İÇİN YETERLİLİK TEST KİTİ GELİŞTİRİLMESİ

DEVELOPMENT OF PROFICIENCY TEST KIT FOR GMO DETECTION IN FOOD AND FEED PRODUCTS

TAHA TURGUT ÜNAL

DOÇ. DR. REMZİYE YILMAZ
TEZ DANIŞMANI

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmenliğinin

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

2019

Taha Turgut Ünal'ın hazırladığı "**GIDA VE YEM ÜRÜNLERİNDE GDO TESPİTİ İÇİN YETERLİLİK TEST KİTİ GELİŞTİRİLMESİ**" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Halil VURAL
Başkan ....

Doç. Dr. Remziye YILMAZ
Danışman ....

Prof. Dr. Sait Aykut AYTAÇ
Üye ....

Prof. Dr. Füsun İnci EYİDOĞAN
Üye ....

Prof. Dr. Utku ÇOPUR
Üye ....

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak /.../.../... tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

12/09/2019

TAHA TURGUT ÜNAL

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım benle kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent v.b.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan "***Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge"*** kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H. Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- o Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir.
- o Enstitü / Fakülte yönetim kurulu gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... ay ertelenmiştir.
- o Tezim ile ilgili gizlilik kararı verilmiştir.

12/09/2019

TAHA TURGUT ÜNAL

ÖZET

GIDA VE YEM ÜRÜNLERİNDE GDO TESPİTİ İÇİN YETERLİLİK TEST KİTİ GELİŞTİRİLMESİ

TAHA TURGUT ÜNAL

Yüksek Lisans, Gıda Mühendisliği Bölümü

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Remziye YILMAZ

Eylül 2019, 172 sayfa

GDO analizi yapan laboratuvarlar hem bu konudaki izleme sisteminin hem de ulusal akreditasyon sistemin önemli bileşenlerindendir. Bu kuruluşlarda yapılan deney, kalibrasyon faaliyetlerinin ulusal ve uluslararası düzeyde kalitesinin sağlanmasının ve sürdürülmesinin en önemli yolu yeterlilik testleri ve laboratuvarlar arası karşılaştırma (YT/LAK) programlarından başarılı sonuçlar elde etmektir. Bu sayede sundukları hizmetlerin yeterliliği konusunda kanıt sağlamış olacaklardır.

Bu çalışmada, genetik modifiye organizma (GDO) tespiti için MIR604 mısır çeşidi ve MON87701 soya çeşidi kullanılarak 8 farklı matristen oluşan yeterlilik test kitinin geliştirilmesi ve bu test materyali kullanılarak ülkemizde GDO analizi yapan laboratuvarlar tarafından TS EN ISO/IEC 17043 akredite yeterlilik testlerinde kullanılmasını sağlayacak bir sistematiğin oluşturulması ve uygulanması amaçlanmıştır. Bu süreç yeterlilik test materyali hazırlanması, DNA ekstraksiyonu optimizasyonu, tek laboratuvar GDO analizleri verifikasyon çalışmaları ve laboratuvarlar arası karşılaştırma organizasyonu aşamalarını içermektedir. Bu kapsamda laboratuvarlar arası karşılaştırma organizasyonu için 40 laboratuvara davet mektubu gönderilmiş ve bunlardan 10 katılımcı laboratuvarın nitel ve nicel analiz çıktıları raporlanmıştır.

Türkiye’de GDO analizleri için YT/LAK program sunucusu teze başlamadan önce bulunmamaktaydı. İlk düzenlenme tarihi 01.04.2019 olan yemde GDO tarama ve GDO tarama kapsamındaki analizler için Tarım ve Orman Bakanlığı Ulusal Gıda Referans Laboratuvar Müdürlüğü de yeterlilik testi hazırlamaya başlamıştır. Bu süreçten öncesinde tüm GDO analiz laboratuvarlarının YT’nin sağlanmasında yurt dışı bağımlılığı bulunmaktaydı.

Bu çalışma ile;

- YT/LAK test kitini ve ilgili analiz metotlarını geliştirilmiş,
- Geliştirilen YT/LAK test kitini GDO analiz laboratuvarlarında uygulanmış ve
- TS EN ISO/IEC 17043 No'lu uluslararası standardı kapsamında akredite YT/LAK Testi hizmeti sunacak bir sistematik oluşturulmuş ve uygulanmıştır.

Bu çalışma, Türkiye’de TS EN ISO/IEC 17043 No'lu uluslararası standardı kapsamında YT/LAK test kiti ile düzenlenen ilk laboratuvarlar arası ortak çalışma niteliğinde olup, laboratuvarlar arası metot birliği, standart sonuçların elde edilmesi ve GDO ile taklit ve tağşişin saptanması konusunda yoğun olarak karşılaşılan problemlerin aşılması hedeflenmiştir. Bu çalışma ile YT/LAK testi geliştirilmesi ve uygulanması ile yeni bir süreç, sistem ve hizmet tesisi etmek amaçlı süreç tanımlama yapılmıştır.

Anahtar Kelimeler: GDO, YT/LAK, Adh1, Le1, MIR604, MON87701, Yeterlilik test kiti

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF PROFICIENCY TEST KIT FOR GMO DETECTION IN FOOD AND FEED PRODUCTS

Taha Turgut ÜNAL

Master of Science, Department of Food Engineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Remziye YILMAZ

September 2019, 172 pages

Laboratories performing GMO analysis are important components of the monitoring system and the national accreditation system. The most important way of ensuring and maintaining the quality of the experiments, calibration activities performed at these institutions at national and international level is to obtain successful results from proficiency tests and inter-laboratory comparison (PT / ILC) programs. In this way, they will be able to provide their adequacy of the services they offer.

In this study, development of a proficiency test kit for the detection of genetically modified organisms (GMOs) by using MON87701 soybean and MIR604 maize events is aimed to establish a system that will be enable of using this test material in all the accredited laboratories performing GMO analysis in accordance with TS EN ISO / IEC 17043 standard.

Thus, PT/ILC process was managed by preparation of proficiency test material, optimization of DNA extraction, single laboratory GMO analysis verification studies and interlaboratory comparison organization. Invitation letters were sent to 40 laboratories for the interlaboratory comparison and a total of 10 participant laboratories' qualitative and quantitative analysis outputs were reported.

There was no PT/ ILC program server for GMO analysis in Turkey before the thesis. The Ministry of Agriculture and Forestry National Food Reference Laboratory has started to produce proficiency test which is related to screening analysis for GM feed. Prior to this period, all GMO analysis laboratories had dependencies on other countries.

With this study;

- The PT/ILC test kit and related analysis methods were developed,
- The developed PT/ILC test kit in GMO analysis laboratories was implemented
- In accordance with the international standard TS EN ISO/IEC 17043, a systematic was developed and implemented to provide accredited PT/ILC testing services.

This study is the first inter laboratory work to be organized with the PT/ILC kit in Turkey under the international standard TS EN ISO / IEC 17043 and with this study we aimed that a consensus about methodology between laboratories, obtaining standard results. With this study, a new process, system and service were provided by the development and implementation of PT/ILC test.

Keywords: GMO, PT/ILC, Adh1, Le1, MIR604, MON87701, Proficiency test

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim boyunca engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, sadece bilimsel anlamda değil sahip olduğu eşsiz bilgisi ile hayatıma yön verip, problemler karşısında getirdiği farklı bakış açıları ufkumu genişleten, desteğini benden esirgemeyerek her zaman yanımda olduğunu hissettiren değerli hocam Sayın Doç. Dr. **RemziyeYILMAZ**'a,

DNA ekstraksiyonu ilk defa gözlemlediğim ve önemli noktalarda not aldığımdan emin olan ve bazı yararlı dokumanların tarafımıza ulaşmasını sağlayan Sayın **Ferruh TOMBUL** ve **İstanbul İl Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü çalışanlarına**,

Çalışmamız boyunca bilgilerini, tecrübelerini ve ekipmanlarını bizlerle paylaşan, beyin fırtınalarımızın yanında yaptığımız hoş sohbetler ile hayatımda önemli yere sahip olmuş ve göstermiş oldukları sabra müteşekkir olduğum **Humen CEBBARİ** ve **Ahmet DEMİRLİÇAKMAK** başta olmak üzere **BM Lab çalışanlarına**,

Tezim kapsamında tarafımızla işbirliği yapmış olan farklı illerdeki Tarım ve Orman Bakanlığı'nda Daire Başkanı **Dr. Neslihan Alper** ve **GDO analizi yapan gıda kontrol laboratuvarları ve çalışanlarına**,

Deneyimin başlangıcından itibaren bilgi ve tecrübesini paylaşıp gösterdiği sabır ile birlikte her durumda rahatça kendisine danışabildiğim için minnet duyduğum **Meltem YILDIRIM**'a,

Hayatım boyunca her koşulda bana destek veren ve sabır gösteren, önceliklerini her zaman benim önceliklerime göre sıralayan ve bunun karşılığını hiç bir zaman tam olarak ödeyemeyeceğim, bugünlere gelmemde en büyük katkıları olan, bu hayatta asla değişmeyeceğim canım ailem; annem **Yetare ÜNAL,** babam **Kamil ÜNAL** ve kardeşim **Derin Yahya ÜNAL'a**,

Tanıştığımız ilk günden itibaren içimdeki potansiyeli görmemi sağlayıp, araştırmacı ruhumu dışarı çıkaran, düşünceleri ve yorumları ile bana hep ilham veren ve desteğini hiç esirgemeyip hakkını asla ödeyemeyeceğim, çok sevdiğim hayat arkadaşım **Büşra ARDIÇLI'ya** ve bana kazandırdığı **ARDIÇLI ailesine**

Sonsuz Teşekkürler…

Taha Turgut ÜNAL

Eylül 2019, Ankara

İÇİNDEKİLER

ÇİZELGELER

ŞEKİLLER

SİMGELER VE KISALTMALAR

ADH1: Alkol Dehigrogenaz

APHIS: Hayvan ve Bitki Sağlığı Denetleme Servisi

AOAC: Tarım Kimyagerleri Resmi Birliği

AOCS: Amerikan Petrol Kimyacıları Birliği

Cq: Eşik döngüsü

CRM: Sertifikalı Referens Materyal

Ct: Eşik döngüsü

EC-JRC-IRMM: Avrupa Komitesi Ortak Araştırma Merkezi- Referans Materyal ve Ölçümleri Enstitüsü

EFSA: Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi

ELISA: Enzim Bağlı İmmünosorbents Deneyi

ENGL: GDO Laboratuvarları Avrupa Birliği Ortak Araştırma Merkezi

OECD: Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü

EPA: Çevre Koruma Ajansı

EtBr: Etidyum Bromür

EU: Avrupa Birliği

FAPAS: Gıda Analizi Performans Değerlendirme Şeması

FDA: Amerika Gıda ve İlaç Dairesi

GeMMA: FAPAS GD Şeması

GIPSA: Tahıl Muayene, Paketleme ve Depolama İdaresi

ISAAA: Tarımsal Biyoteknoloji Uygulama ve Bilgilendirme Kuruluşu

ISO: Uluslararası Standardizasyon Organizasyonu

ISTA: Uluslararası Tohum Test Birliği

GD: Genetik Modifiye

GDO: Genetik Modifiye Organizma

gDNA: Genomik DNA

Le1: Lektin

LOD: Tespit Limiti

LOQ: Ölçüm Limiti

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RSD_R: Laboratuvariçi Tekrar Üretilebilirlik için Standart Sapma

RSD_r: Tekrarlanabilirlik için Standart Sapma

RSU: Relatif Standart Belirsizlik

Q-PCR: Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu

USDA: Amerika Birleşik Devletleri Tarım Dairesi

WHO: Dünya Sağlık Örgütü

YT/LAK: Yeterlilik Testi / Laboratuvarlararası Karşılaştırma



1. GİRİŞ

Genetik modifiye organizma (GDO) analizi yapan laboratuvarlar hem bu konudaki onay, izleme ve denetim sisteminin ve hem de ulusal akreditasyon sisteminin önemli bileşenlerindendir. Bu kuruluşlarda yapılan deney faaliyetlerinin ulusal ve uluslar arası düzeyde kalitesinin sağlanmasının ve sürdürülmesinin en önemli yolu yeterlilik testleri ve laboratuvarlar arası karşılaştırma (YT/LAK) programlarından başarılı sonuçlar elde etmektir. Bu sayede kendi kalite güvence sistemlerinin sürdürülebilirliği ve sundukları hizmetlerin yeterliliği konusunda kanıt sağlamış olacaklardır.

Modern toplumların refah düzeyi, ekonomik rekabet gücü, üretim ve ticaret kalitesinin arttırılmasında güvenilir ve izlenebilir ölçümler önemli rol oynamaktadırlar. Bu ölçümler, gelişmiş bir altyapıya sahip olunması ile sağlanmaktadır. Ölçümlerin güvenilirliğinin sağlanmasında test laboratuvarlarının rolü gün geçtikçe artmaktadır. Özellikle GDO analizleri yapan akredite veya akredite olmayı planlayan laboratuvarların vermiş oldukları hizmet kalitesinin göstergesi bakımından; referans standartların izlenebilirliklerinin sağlanması ve ölçüm sistemlerinin verilen kapsamdaki faaliyetler için uygunluğunun garanti altına alınması gerekmektedir. Ölçüm sistemi bütününde etkinliğinin değerlendirilmesi ve iyileştirilmesi ancak laboratuvarların yeterlilik ve karşılaştırma testlerine (YT/LAK) katılımı ile gerçekleştirilebilir [1].

Yeterlilik testleri (YT) ve laboratuvarlar arası karşılaştırma (LAK) ölçümleri, laboratuvarların güvenilirliğinin sağlanmasında önemli bir yer teşkil etmektedir. Ülkemizde karşılaştırma ölçümlerinin düzenlenilebilmesi için, bir kalite yönetim sistemine (TS EN ISO/IEC 17025) göre akredite olunması ve LAK/ YT için gerekli minimum kriterlerin sağlanması yeterli kabul edilmektedir [2]. Fakat 2010 yılı itibarı ile standart haline getirilen TS EN ISO/IEC 17043 Standardının kullanılması, ölçüm ve değerlendirmelerin amacına ulaşabilmesi noktasında önem arzetmektedir [3]. Bu çalışma başlatıldığında, Türkiye'de GDO analizleri için, düzenli ve yerel bir YT/LAK program sunucusu ve üreticisi bulunmamaktaydı. Ancak 30 Nisan 2019 tarihinde Türk Akreditasyon Kurumu

Yeterlilik Testi Veri Tabanı (YETBİS) incelendiğinde Tarım ve Orman Bakanlığı, Ulusal Gıda Referans Laboratuvarı tarafından yalnızca işlenmiş gıdada GDO tarama ve GDO tarama kapsamındaki analizler için yeterlilik testi çağrısına çıkıldığı görülmektedir. İlgili test sonuçlarının duyurulma tarihi ise 28 Haziran 2019 olduğu bildirilmektedir. Dolayısı ile özellikle GDO tip belirleme ve miktar tayini için halen tüm GDO analiz laboratuvarlarının yurt dışı bağımlılığı bulunmaktadır. Dolayısı ile özellikle GDO tip belirleme ve miktar tayini için halen tüm GDO analiz laboratuvarlarının yurt dışı bağımlılığı bulunmaktadır.

Bu sistemde, istatistiksel yöntem kullanımı, bir çevrimin planlanmasının önemli parçasını oluşturmaktadır. İstatistiksel tasarım; planlama, verilerin toplanması, analizi ve raporlanması aşamalarını kapsar. LAK çevriminde sonuçların değerlendirilmesi aşamasında, ISO 13528 Laboratuvarlararası Karşılaştırma Metodu ile Yeterlilik Testinde Kullanım için İstatiksel Yöntemler Standardı verilerin kullanımı ve analizlerinin yapılabilmesi için tavsiyeler vererek TS EN ISO/IEC 17043'ü tamamlamaktadır [4,5]. TS EN ISO/IEC 17043 standardı, test sağlayıcılarının yeterliliğine, LAK ölçümünün organizasyonuna, bu organizasyonun yürütülmesine dair genel koşulları belirlemektedir. Test sağlayıcıların TS EN ISO/IEC 17025 standardına bağlı kalarak gerçekleştirdikleri karşılaştırma ölçümleri ile TS EN ISO/IEC 17043 standardına göre organize edilen karşılaştırma ölçümleri karşılaştırıldığında TS EN ISO/IEC 17043 standardı ile daha sağlıklı yürütülüp sonuçlandırıldığı gözlenmiştir [1]. Yeterlilik testi oluşturulmasında Avrupa Akreditasyon(European Accreditation) yayınları [6], ILAC [7] ve TÜRKAK [8] dokümanları da rehber olarak kullanılan ve diğer dokümanlardır.

Bu tez kapsamında genetik modifiye organizma analizleri için YT/LAK test kiti ve ilgili analiz metotları geliştirilmiş, geliştirilen YT/LAK test kiti GDO analiz laboratuvarlarında uygulanmış ve TS EN ISO/IEC 17043 No'lu uluslararası standarda uygun olarak YT/LAK testi hizmeti sunulmuştur.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Genetik Modifiye Organizma

Genetik modifiye organizma (GDO) için farklı kaynaklarda farklı tanımlar bulunmaktadır. Tarımsal Biyoteknoloji Uygulama ve Bilgilendirme Kuruluşu (ISAAA) ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) GDO'yu, genetik materyali doğada veya geleneksel ıslah yöntemleri ile oluşamayacak şekilde, rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak, genetik materyalinin yapay olarak değiştirilmesi sonucu oluşan canlı organizmalar şeklinde tanımlar [9,10]. Amerika Birleşik Devletleri Tarım Dairesi (USDA) ve Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) genetik modifikasyonun geleneksel uygulamaları ve genetik mühendisliği uygulamalarını içerebilmesi nedeni ile genetik modifikasyon yerine "genetik mühendisliği uygulanmış organizmalar" olarak tanımlamaktadır [11,12].

GDO'da DNA kompozisyonunun değişimi ile alıcı organizmanın genotipi doğal yapısından farklılaşır. Genetik modifiye organizma eldesi için işlemlerin laboratuvar ortamında planlı olarak gerçekleştirilmesi gereklidir. Ayrıca, hedef sekansın silinmesi, nokta mutasyonları, belli genlerin çoğaltılması da laboratuvar koşullarında gerçekleşmesi durumunda genetik modifikasyon olarak adlandırılabilir. Genetik modifikasyon yeni proteinlerin sentezlenmesi veya sentezlenen proteinlerin ifadelerinin değişimi nedeni ile moleküler düzeyde genotip ve fenotipi değiştirebilir.

DNA aynı tür veya farklı türdeki canlılar arasında transfer edilebilir. Ayrıca, eklenecek olan DNA modifiye edilebileceği gibi isteğe göre yeniden de düzenlenebilir. Eğer transfer edilecek olan DNA'nın tümü aynı türden gelip herhangi bir modifiye veya düzenlemeye tabi tutulmamış ise bu cisgenik olarak adlandırılır ve bu tip gen transferleri doğada da gerçekleşmektedir.

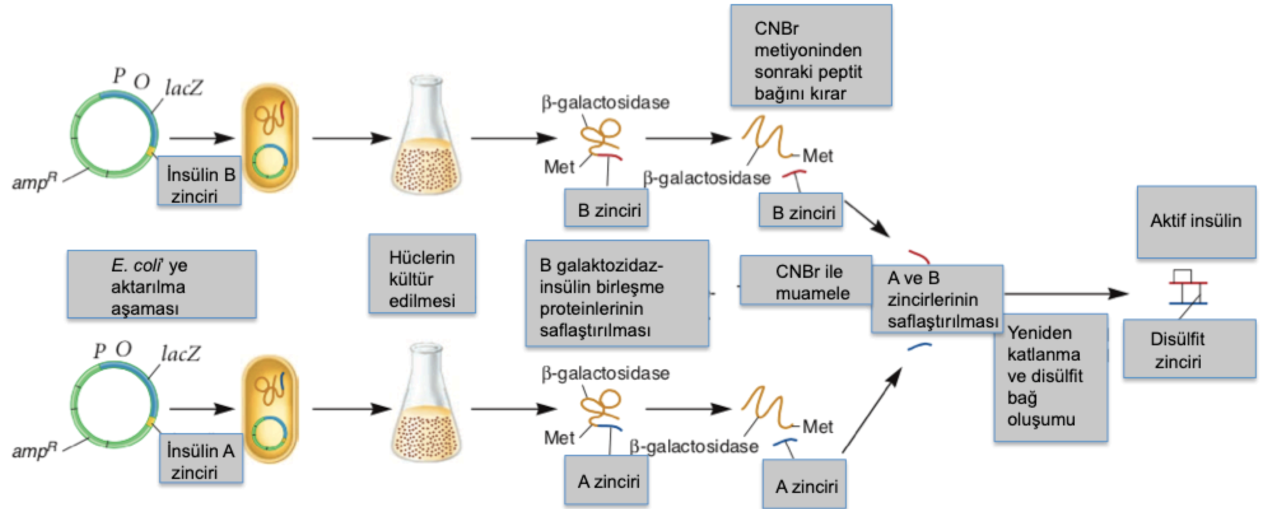
Transgenik ürünlerin üretilmesinde aşağıdaki işlemler yer almaktadır[13]:

1) İstenen geni taşıyan organizmanın tanımlanması,
2) Bu organizmadan istenen genin izolasyonu,
3) Modifiye gen dizisinin istenen genin füzyonu ile oluşturulması, genin işlevselliğinin kontrol edilmesi amacıyla destekleyici bir dizinin hazırlanması, ve hedeflenen gen aktif olarak saptanamadığında floresan protein veya antibiyotiğe dayanıklı faktör içeren işaretli genin

oluşturulması ile birlikte genin varlığının belirlenmesine yardımcı olunması,

4) Rekombine dizinlerin çoklu kopyalar oluşturmak üzere genellikle bir bakteri içerisinde çoğaltılması,
5) Gen silahı veya biyolojik bir ajan yardımı ile ilgilenilen genin kopyalarının modifiye edilmek istenen organizmaya eklenmesi,
6) İşaretli gen vasıtasıyla istenen geni başarı ile alan organizmaların belirlenmesi,
7) Modifiye bitkilerin çoğaltılması

1982 yılında FDA tarafından kabul edilen, genetik mühendisliğine uğramış ilk ticari ürün, insan insülini üretimi için bakterilerin kullanılması Şekil 2.1. ' de gösterilmiştir [14].



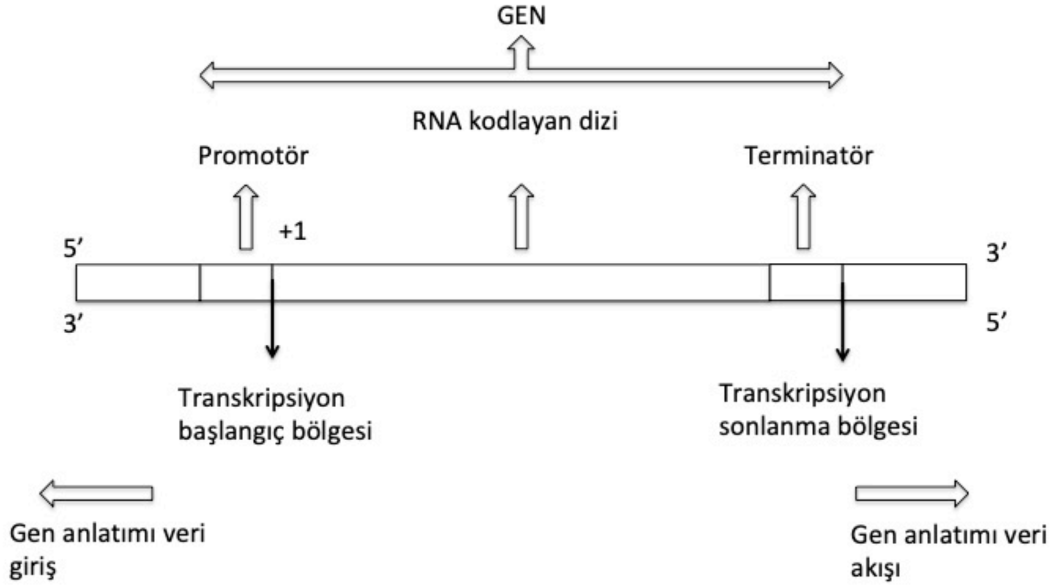
Şekil 2.1. 1982 yılında FDA tarafından kabul edilen, genetik mühendisliğine uğramış ilk ticari ürün olan insülin sentezi

2.2. Genetik Modifikasyonun Yapısı

Genetik modifikasyon organizmanın genomuna gen kasetinin yerleştirilmesi, organizmadaki DNA dizisinin delesyonu, hedef dizi için nokta mutasyonları, istenen genlerin çoğaltılması gibi yolları izleyebilir. Bugüne kadar, gen kasetinin organizmaya insersiyonu en çok kullanılan yöntemdir.

Bir gen kaseti genellikle, sırasıyla promotör, ilgilenilen gen ve terminatör bileşenlerinden oluşmaktadır. Bu temel bileşenlere ek olarak transkripsiyon düzenleyicileri ve ileri transkripsiyonel uyarıcı bileşenleri olarak katkıda bulunan arttırıcı(enhancer), intron veya sinyal motifleri gen kasetlerine aktarılabilir. Bu

DNA dizileri transkripsiyon veya translasyon aşamasında rol oynayabilirler. Gen ifade kaseti Şekil 2.2.' de verilmiştir [15].



Şekil 2.2. Gen ifade kaseti

2.2.1. Gen Kaseti, Promotör, Transgen ve Terminatör

Bir gen kasetinin ana unsurları genellikle promotör, ilgilenilen gen ve terminatörden oluşmaktadır. Bunlar dışında gen kasetlerine transkripsiyonel ayarlamada ve ileri transkripsiyonel işlemlerde görevleri olan arttırıcılar (enhancer), intron veya sinyal motifleri aktarılabilir. Bu DNA dizileri transkripsiyon ya da translasyon aşamasında önemli rol oynayabilirler.

Promotör genler ökaryot ve prokaryotlarda transkripsiyonun başlamasından sorumlu DNA dizileridir. 100 ile 1000 baz çifti uzunluğunda bulunan, bir genin nerede ve ne zaman transkripte edileceğini belirlemeye yardımcı olan elemanlara denir.

Trans gen, gen kasetinin ortasında bulunan ve transkripsiyon sonucu fonksiyonel proteini oluşturan kısma denir.

Terminatör, prokaryot ve ökaryotlarda transkripsiyonu durdurmakta görevli olan dizilere denir.

Biyoteknolojide gen kasetlerinin oluşturulmasında yararlanılan başlıca 4 adet promotör gen tipi vardır.Bunlar konstitütif promotör genler, dokuya spesifik veya

gelişim evresine spesifik promotör genler, uyarılabilir promotör genler ve sentetik promotör genlerden oluşmaktadır.

Genetik modifiye (GD) ürünlerde transgen ifadesini sağlamak için promotör gen seçimi çok önemlidir. Promotör gen, transgen ifadesini kalite ve miktar bakımından oldukça etkiler.

Çalışma kapsamında MIR604 Mısır ve MON87701 Soya ele alındığından bu ürünlerde bulunan konstitütif promotör genler önemlidir.

Konstitütif promotör genler; hiç bir çevresel faktör ile ilgili değildir ve tüm durumlarda aktif olan promotör genlere verilen isimdir. Genellikle virüslerde ve bitkilerde bulunan güçlü promotör genlerdir. Bitki kökenli konstitütif promotör genler ubiquitin veya aktin genlerinden sağlanır [16].

Bugüne dek Avrupa Birliği (AB) otoritesi tarafından onaylanmış genetik modifiye gıdaların çoğunda 35S promotör ve nos terminatörü bulunduğundan bu genetik elementlerin hedef dizilimler olarak kullanımı ile çoğu genetik modifiye gıda saptanmaktadır [17].

2.2.1.1. Genetik Modifiye Bitkilerde Promotör Gen

Genetik modifiye yapıda, zaman, yer, transgenin ifade olma derecesi oldukça önemlidir. Genetik modifiye bitki oluşturmanın ardında yatan asıl neden transgenin normal bir genden daha fazla ifade olmasına dayanır. Bu aşamada promotör genler oldukça önem kazanmaktadır. Promotör genler nitelik ve nicelik bakımından transgenin ifade olmasını etkilemektedirler.

İlk olarak, transkripsiyonun başlangıç işlemi için promotör genin bitkinin yapısına uyumlu olması gerekmektedir. İkincisi, promotör gen, transgen ile uyum içinde olmalıdır. Son olarak promotör genin transkripsiyon başlangıç faktörüne olan ilgisi önemlidir. Genellikle transgenin fazla ifade olması için güçlü promotör genler seçilir. Bitkiler için güçlü promotör genler bitki virüslerindeki konstitütif promotör genlerdir. Bu promotör genler bitki türleri ile uyumludur. Bu durum bitki virüsünün kendi genomunu hedef bitkiye aktararak bitkideki transkripsiyon başlama faktörünü ve Pol II kullanıp virüs geni olarak transkripsiyon başlatma mekanizmasının çözülmesinden bu yana bilinmekteydi. Bu nedenle seçilen promotör gen dizileri ve olası dezavantajları bakımından çok iyi karakterize edilmelidirler. Bitki virüslerinin konstitütif promotör genlerine ek olarak, bitki kökenli güçlü konstitütif promotör genler transgenin ifade olması için kullanılabilir. Bitki kökenli güçlü konstitütif promotör genler aktin ve ubikuitin

genlerinden kaynaklanmaktadır [16]. Çoklu transgen aynı konstitütif promotör gen tarafından ifadelenmekte ise problemler meydana gelebilir [18]. Bu gibi durumlarda promotörlerde önbaşlangıç kompleksine olan ilgileri aralarında oluşan rekabetten azalacağı için transgen ifadesi susturulabilir.

Yukarıda belirtildiği gibi DNA'nın translasyona uğramayan promotör gen ve terminatör gen kısımları transkripsiyon işleminde önemli rol oynarlar. Genetik modifikasyon için promotör ve terminatör genin seçimi konak hücre ile uyumlu olmaları gerektiğinden önemlidir. Buna ek olarak promotör gen, aktarılan genin yüksek düzeyde ifadelenmesini sağlamak için oldukça güçlü olması gerekmektedir. Bu nedenle promotör ve terminatör genler bitki virüslerinden seçilirler. Bunun nedeni bitki virüsü genomlarının bitki traskripsiyonel enzimleri ile uyumlu olmaları ve promotör gen bölgelerinin yerli konstitütif promotör genlere kıyasla oldukça yüksek olmasından kaynaklanmaktadır.

Promotör ve terminatör genlerinin seçimi GDO'larda saptama için ilk aşama olan tarama metodu içinde bu bileşenlerin aranması nedeni ile oldukça önemlidir.

GDO analizinde yalnızca promotör ve terminatör gen dizilerinin aranması maliyeti düşürebilir ancak yanlış pozitif sonuçlar verebilmektedir. Bunun nedeni bitkinin gerçekten promotor veya terminatör genin kökenini aldığı bitki virüsü ile kontaminasyonu durumudur. GD bitki yapısında CaMV p35S, pFMV, pNOS, pSSuAra, pTa29, pUbi, pRice aktin promotör genleri genellikle kullanılan promotör gen bölgeleridir ve tNOS, t35S, tE9, tOCS ve tg7'de aynı şekilde yaygın kullanılan terminatör gen bölgelerindendir[19]. Bu promotör ve terminatör dizilerinin saptanması Avrupa Birliği tarafından onaylanmıştır. CaMV 35S promotör geni ve *nos* terminatör geni için Bt11 GD mısır çeşidi kullanılarak Türkiye'de gıda ve yem ürünlerinde varlığına dair yapılan kalitatif çalışmalar literatürde mevcuttur [20].

2.3. DNA'yı Aktarmada Kullanılan Metotlar

Yeni bir DNA'nın organizmaya aktarılmasına genetik transformasyon adı verilir. Transformasyon metotlarını kendi içinde doğrudan ve dolaylı transformasyon olmak üzere iki gruba ayırabiliriz. Dolaylı transformasyon yabancı DNA'nın hedef organizmaya aktarılması esnasında bakteri gibi bir organizma yardımı ile gerçekleşmesine dayanır. Bitki transformasyonlarında dolaylı transformasyon

Agrobacterium tumefaciens aracılığı ile gerçekleştirilir. Doğrudan transformasyonlar ise protoplast transformasyonu ve mikro enjeksiyon yöntemi gibi fiziksel yöntemlere dayanır [21]. Yabancı DNA'nın hedef organizma ile tanıştırılmasında yeniden üretilebilir metodoloji birçok parametreye gereksinim duyar [22].

1) Düşük maliyet, işlemin güvenliği, kolay prosedür ve teknik olarak kolaylık her GD çeşidi için önemlidir.

2) Hedef organizma ile aktarılacak DNA vektör DNA'sından ayrı olmalıdır.

3) Entegrasyon sayısının düşük kopya sayıları ve entegre olan DNA'nın yerinin (lokasyonun) farkındalığı gereklidir.

4) Transforme olan elementin rejenerasyonu tek transforme hücreden olmalıdır.

2.3.1. Dolaylı Transformasyon

2.3.1.1. *Agrobacterium tumefaciens* aracılığı ile Transformasyon Yöntemleri

Agrobacterium cinsi, çift çenekli ve tek çenekli, açık tohumlu ve kapalı tohumlu bir çok bitkide hastalığa neden olan toprak bakterisidir. *Agrobacterium tumefaciens* taç uru (tümör oluşumu)'na neden olan Agrobacterium cinsi bakteridir. *A.tumefaciens* tümöre neden olan Ti plazmidini taşır. Buradaki T-DNA bölgesi nükleer konak genoma kendisini dahil eder [23]. Ti plazmidi yabancı genin bitki hücresine aktarılmasına olanak verir ve biyoteknolojik bir araç olarak vektör adı altında kullanılır [24]. DNA dizisinin isteğe ve ihtiyaca göre uygun olması için T-DNA bölgesi değişik klonlama yöntemleri ile düzenlenebilir. *A.tumefaciens* aracılığı ile transformasyon çift çenekli bitkiler için uygun iken tek çenekliler için yetersiz kalmaktadır [19].

2.3.2. Doğrudan Transformasyon

2.3.2.1. Protoplast Oluşumu ve Elektroporasyon Yöntemleri

Protoplast kimyasal ve fiziksel işlemler ile hücre duvarının tamamen veya kısmen ortadan kalktığında kalan hücreye denmektedir. Protoplast ozmotik olarak kırılgan bir yapıdadır. Protoplast diğer tüm hücrelere dönüşebilecek potansiyeli olan (totipotent) bir hücre olduğundan birleşme ve transformasyon için kullanılır [25]. Pektinaz ve selülaz gibi enzimatik reaksiyonlar ile hücre duvarı ortamdan uzaklaştırılır. Pektinazın hücre duvarını ayırdıktan sonra

selülaz hücre duvarını ortamdan kaldırır [26]. Hücre duvarının kalınlığı, sıcaklık ve enzimin inkübasyon süresi, pH, sallanma (agitation) ve osmotik denge protoplastın ortaya çıkmasında rol oynayan önemli faktörlerdir [27]. Hücre duvarının ortamdan uzaklaşmasından sonra protoplast integrasyon veya transformasyona tabi tutulur.

Protoplast kırılgan olduğundan, içerisine DNA alımı kimyasal veya fiziksel prosedürler ile kolaylıklakla yapılmaktadır. İlk olarak plazmit doğrusallaştırılır. Sonra protoplast ve plazmit karıştırılır, protoplast-plazmit karışımı PEG uygulamasına tabi tutulur ve elektroporasyon gerçekleştirilir [25].

Elektroporasyon ortamdan hücreye elektrik akımı kullanılarak DNA aktarımını sağlayan bir transformasyon metodudur. Elektrik akımı hücre zarını bozarak DNA'nın (ve çözeltideki diğer moleküllerin) hücre içine kolaylıkla geçebildiği porları oluşturur [28].

Bu transformasyonda entegrasyon sıklığının düşüklüğü sonucu ısı şoku yöntemi ve ışınlama gibi yöntemler ile arttırılabilir [25]. Bu teknik şeker pancarı için uygundur [29].

2.3.2.2. Bitki Hücresi veya Dokunun Mikropartikül Bombardımanı Yöntemi

Mikropartikül bombardımanı biolistik veya gen silahı tekniği adı ile de bilinir. Bu yöntem yüksek yoğunluklu bir taşıyıcının ilgilenilen gen ile kaplanmasından sonra ivmelendirilmesi sonucu hücreden geçip gitmesine bu sırada DNA parçalarının hücre içinde kalmasına dayanmaktadır [22].

Mikropartiküller genellikle yaklaşıp çapı 2 mikron olan tungsten, altın veya platin gibi ağır metallerden seçilir. Bu mikropartiküller plazmit DNA süspansiyonu ile karıştırılır. Mikropartikülün üstüne DNA'nın çökmesine olanak veren $CaCl_2$ ve spermidin içermeyen baz eklenir. Bunun sonucunda mikropartiküller DNA ile kaplanmış olur. DNA ile kaplanmış mikropartiküller bir petride bulunan hedef hücre biyolistik aracı veya gen silahı ile fırlatılır. Partikülün hedef hücreye penetrasyonu için partikül hızı ve basınç DNA'nın boyu, tipi ve organizma dokusuna göre optimize edilir. Mikropartiküller hücreye çarpınca bazı DNA'lar hedef hücrenin gDNA'sına yayılır. Bombardımandan sonra, hedef hücrelerin transformasyonunun görselleştirilebilmesi amacı ile hedef hücreler birbirlerinden olabildiğince ayrı olmak üzere ortama inokule edilir. Biyolistik metodunun çıktıları, hedef hücre ile tanıştırılan DNA'nın kopya sayısı ve genom üzerindeki yeri bilinmediği için tahmin edilemezdir. Entegre olmuş çoklu kopya soyası ve

bilinmeyen lokasyon gen anlatımının uyarılması ve susturulması gibi istenmeyen yan etkiler meydana getirebilir [22]. Yöntemin verimliliği hücre sayısı, hücre tipi, basınç, mikropartikül üstüne çöktürülen DNA miktarı, mikropartikül ivmelendirme oranı ve sıcaklık gibi parametrelere bağlıdır. Bu teknik tek çenekliler için dizayn edilse de çift çenekliler içinde oldukça kullanışlı bir yöntemdir.

2.3.3. Transformasyon Yöntemlerinin Karşılaştırılması

Transformasyon yöntemleri Tablo 2.1.'de karşılaştırılmıştır.

Tablo 2.1. Transformasyon yöntemlerinin avantaj ve dezavantajlarının karşılaştırılması

Yöntem	Avantajları	Dezavantajları
A. tumefaciens aracılığı ile sağlanan transformasyon	Genom entegrasyonunda kesinlik Düşük kopya sayısı Nesiller sonra bile istikrarlı bir entegrasyon Yüksek verimli [24]	İşlemlerdeki yavaşlık ve komplekslik Vektörler ile önişlem Steril bir protokol Tek çenekli bitkiler için yetersiz
Protoplast oluşumu ve elektroporasyon	Basit Hızlı yöntem Ucuz Farklı hücre tipleri için uygun [25]	Protoplastlar için ön işlem Düşük transformasyon verimliliği Genoma rasgele entegrasyon Beklenmeyen sonuç beraberinde entegre olan çoklu kopyalar
Biyolistik	Basit Hedef hücreler için önişlem yok Entegrasyonda yüksek kopya numaraları Değişik hücre tipleri için uygun [16]	Pahalı araç Beklenmeyen sonuç beraberinde entegre olan çoklu kopyalar Düşük transformasyon verimi Genoma rasgele entegrasyon [16]

2.4. Genetik Modifiye Organizmaların Sınıflandırılması

GDO'ların sınıflandırılması hedef hücreye tanıştırılacak olan DNA'nın kökeni, DNA dizi bilgisi ve yasal olarak onaylanma durumlarına göre yapılabilir.

2.4.1. Yeni DNA'nın Kökenine göre Yapılan Sınıflandırma

Yapıya dahil edilecek yeni DNA'nın kökenine göre yapılan sınıflandırma tek özellik, yığın özellik, near intragenik, intragenik ve cisgenik olmak üzere 4 gruba ayrılmaktadır. Bu kavramlar aşağıda alt başlıklar halinde açıklanmıştır.

2.4.1.1. Tek Özellik Tipi (Single Trait Type)

Tek özellik tipi GDO'ların birinci jenerasyonudur. Çoğu ticarileşmiş GDO enzimatik olarak kesilip yapıştırılan teknoloji ile üretilen tek özellik transgeni taşır [30]. İstenilen tek özellik verici türlerinden restriksiyon endonükleaz sindirimi ile saflaştırılır. İstenilen bu özellik, restriksiyon endonükleaz enzimlerinin sindirme ve bağlama fonksiyonları ile uygun bir promotör ve terminatör bölgesi ile birleştirilir. Gen kaseti vektör içine klonlanır ve anlatılan yöntemlerden uygun olanının kullanılması ile birlikte alıcı organizmaya transforme olur. Genelde vektör seçici bir işaretleyici (selektif markör) ve istenilen gen kasetinin hedef organizmaya aktarılması için çoklu bağlanma noktaları içerir.

2.4.1.2. Yığın Özellik Tipi (Stacked Trait Type)

Yığın özellik tipi GDO'ların ikinci jenerasyonlarıdır. Bunlar ilk jenerasyonun melez geçişi veya birinci jenerasyonun tekrar dönüştürülmesi ile meydana gelirler. Bu yüzden yığın özellik tipinde, birden fazla özellik olabilir ama her yığın özellik bir GD çeşidi olarak adlandırılmaktadır. Çoğu ticari ürün ve yasal olarak onaylanmış GDO'lar yığın özellik gösteren GDO'lardır [31].

2.4.1.3. Yakın Kalıt İçi Özellik Tipi (Near Intragenic)

Yakın kalıt içi tipi GDO'ların üçüncü jenerasyonudur. Genomu kalıt içi modifikasyon ile değişen organizmalar GDO olarak kabul edilir. Bu tip GDO'larda genoma dahil edilecek DNA'nın büyük kısmı aynı organizma kökenlidir. Rekombinant kısım uzunluk bakımından oldukça kısıtlıdır [30].

Saptanacak olan dizinin kısalığından dolayı bu tipteki GDO'lar tek tip ve yığın tip GDO'lara kıyasla daha zor tespit edilir.

2.4.1.4. Kalıt içi ve Cisgenic Özellik Tipi (Intragenics ve Cisgenics)

Intragenic ve Cisgenic tip GDO'lar dördüncü jenerasyon GDO'lardır. Genomu intragenic ve cisgenic olarak modifiye olmuş organizmalar genoma dahil edilecek olan DNA parçasının tümü aynı türün gen havuzundan gelmesine rağmen GDO olarak düşünülür. Gen havuzu doğal olarak rekombine olmuş genlerden oluşmaktadır. Bu nedenle genoma dahil edilen DNA'nın saptanması oldukça zordur. Tek özellik tipi, yığın özellik tipi ve yakın kalıt içi tipinden farklı olarak intragenic ve cisgenic'lerin tür genetik haritası kullanılarak saptanması

potansiyelini barındırır. Bunun nedeni eklenen DNA'nın gen düzeni ve eklenme bölgesi doğal türlere göre farklı olmasına dayanır [30].

2.4.2. DNA Dizi Bilgisine Göre Sınıflandırma

Eklenen bileşenlerin, bileşenlerin organizasyonunun ve genomda bulunan bölgenin düzgün bir şekilde saptama ve tanımlama amacı ile GDO'lar DNA dizi bilgisine göre sınıflandırılırlar. Analitik analizler için bu sınıflandırma oldukça önemlidir. Karakterizasyon amaçlı 4 sınıf içerir [30]:

1) Tamamen karakterize edilmiş GDO'lar
2) Sadece eklenen gen kaseti iyi karakterize edilmiş GDO'lar
3) Tamamen karakterize edilmiş GDO'ların varyantları
4) Eklenen DNA elemanları asla karakterize edilmemiş olan GDO'lar

2.4.2.1. Tamamen Karakterize Edilmiş GDO'lar (Bilgi Seviyesi 1)

Eklenecek olan DNA, diğer deyiş ile gen kaseti ve genoma eklenecek olan DNA'nın yeri tamamen karakterize olmuş ve bilinmektedir. AB tarafından onaylanmış ve ticarileşen tüm GDO'lar tamamen karakterize olmuş GDO'lardır. Bu sınıfta, saptama ve tanımlama Q-PCR çeşide(Event) spesifik metotlar ile yapılmaktadır [30].

DNA dizisi iyi karakterize edilmiştir. Çeşidi belirten GDO'larda herhangi başka bir varyasyon kesinlikle yoktur, aksi takdirde Q-PCR çeşide spesifik metodlar ile saptanıp tanımlanamaz. Varyasyonun yeri analitik sonuçları etkiler. Eğer bu varyasyon tamamlayıcı dizinin en az bir primer veya probu uyumlu ise saptanamaz veya tanımlanamaz.

2.4.2.2. Bilgi Seviyesi 1'de Kullanılan Aynı Genetik Yapı ile Transforme Edilen GDO'lar (Bilgi Seviyesi 2)

Bilgi seviyesi 2 eklenecek DNA yapısının iyice tanımlanmış olmasına rağmen eklenen DNA'nın yerinin tanımlı olmadığı yada bilinmediği durumlarda karşımıza çıkar. Bu sınıf genellikle tamamen tanımlanmış GDO'ların sıklıkla kullanılan DNA yapılarından oluşmaktadır. Bu GDO'lar tamamen karakterize olmuş GDO'ların kızkardeşi veya yedeği olarak adlandırılırlar [30]. Diğer yandan, bu sınıfa yasal olarak onay verilemediğinden ticarileşemez. Saptama ve tanımlama metodları tamamen karakterize olmuş GDO'lara göre çeşide-spesifik metodların uygun olmamasından dolayı farklıdır. Bu sınıf Q-PCR çeşide

– spesifik metotlar ile saptanıp tanımlanamaz fakat yapı spesifik (construct-specific) metotlarla saptanıp tanımlanabilir.

2.4.2.3. En Azından Bir Bileşeni Bilgi Seviyesi 1'de Bulunan Genetik Bileşenlerin Yeni Kombinasyonu ile Transforme olmuş GDO'lar (Bilgi Seviyesi 3)

Eklenen gen kasetinde P-35S, T-35S ve T-nos gibi diğer GDO'larda iyi tanımlı olan en az bir genetik bileşen bulunur. Bunların saptanması işlemi element-spesifik saptama ile gerçekleşir. Buna rağmen GD yada GD olmayan etiketini yapıştırılması oldukça zordur. Saptanan bileşenin GD olmayan kaynaktan mı geldiği veya 1'den fazla onaylanmış GDO'dan birleşen bir varlığın söz konusu olup olmadığının kararı verilmelidir [32].

2.4.2.4. Yalnızca Yeni Genetik Bileşenler ile Transforme Olmuş GDO'lar (Bilgi Seviyesi 4)

Sadece aktarılan gen için değil aynı zamanda DNA bileşenleri diğer sınıflarda olduğu gibi karakterize edilmediğinden bu sınıfa ait bir bilgi bulunmamaktadır. GDO'lar için geçerli saptama metotları bu tipteki genetik modifikasyonları ne saptayabilir ne de tanımlayabilir.

2.4.3. Onay Durumuna Göre GDO'ların Sınıflandırılması

GDO'lar yasal düzenleme prosedürlerine uygunluk bakımından onaylanmış GDO'lar ve onaylanmamış GDO'lar olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Onaylı GDO'lar ilgili otorite tarafından onay verilmiş ve düzenlenmiş olduklarından yasaldır, onaysız olan GDO'lar ilgili otorite tarafından onaylanmadığından yasal değillerdir [30]. Onaylanmamış GDO'lar kasıtlı olarak veya kasıt dışı pazara sürülebilirler [33]. Buna ek olarak GDO'lara verilen onaylar ülkeden ülkeye, gıdadan yeme ve endüstriyel kullanıma göre değişmektedir.

Onay gıdanın, yemin ve türetilmiş ürünlerin ekim izni ve pazarlama onayı olmak üzere 2 gruba ayrılmaktadır [34].

2.4.3.1. Onaylanmış GDO'lar

Onaylanmış GDO'lar yasal olarak gıda, yem veya endüstriyel kullanım ve çevre sağlığı için güvenli olması beklenen GDO'lardır. Bunlarda, kapsamlı risk değerlendirmesi ile saptama ve nicel olarak ölçümü için analitik metotlar açıklanmalıdır. Onaylı GD çeşitlerinin genetik modifikasyon stratejisi, eklenen DNA dizisi (promotör, terminatör, ilgilenilen gen, markör gen vb.), eklenen DNA dizisinin yeri tam olarak bilinmektedir. Bu çeşitlerin klinik testleri yapılmıştır.

2.4.3.2. Onaylanmamış GDO'lar

Onaylanmamış GDO'lar gıda, yem ve endüstriyel kullanımlar için risk değerlendirmeye tabi tutulmadığından yasal düzenlemelere uygun değildir. Onaylanmamış bir GDO'nun pazarda saptanmasının bulaşı gibi bazı beklenmeyen durumlardan kaynaklanan sebepleri olabilir.

Onaylanmamış GDO'lar genetik yapı bakımından onaylanmış GDO'lar ile benzerdir. Böylece, yapıya spesifik veya bileşen tarama metotları ile birlikte onaylanmış GDO'lardaki gibi saptanabilir. Onaylanmamış GD bitkinin varlığı ulusal ve uluslararası yasa ve yürütmelik ile katı bir şekilde yasaklandığından bu ürüne dair nitelik ve niceliğe bakılmasına gerek yoktur [32].

2.5. Dünyada Genetik Modifiye Bitkiler

1996 yılında, ilk GD tohumlar Amerika Birleşik Devletlerinde ticari olarak ekilmiştir. Bu bitkilerin büyük çoğunluğu kanola, pamuk, mısır, soya fasülyesi, şeker pancarı ve şeker kamışıdır [35].

GDO'lar, bir böcek direnci veya kuraklık koşullarına tolerans gibi istenen bir özelliği elde etmek için üretilmektedir. Günümüzde ABD'de mevcut genetik olarak değiştirilmiş 10 ürün şunlardır: yonca, elma, kanola, mısır (tarla ve tatlı), pamuk, papaya, patates, soya fasulyesi, kabak ve şeker pancarı.

Böcek direnci: Bu özellik kategorisi, çiftçilere hedef zararlılara karşı sezon boyunca koruma sağlar, böcek ilacı uygulamalarına olan ihtiyacı azaltır ve girdi maliyetlerini düşürür.

Kuraklık toleransı: Kuraklığa toleransı ifade eden GD çeşitleri daha iyi nem tutma özelliğine sahiptir ve ek sulama gerekmeden kuraklık koşullarına daha iyi dayanabilir.

Herbisit toleransı: Spesifik herbisitleri tolere etmek için geliştirilen GD çeşitler, çiftçilere yalnızca gerektiğinde hedeflenmiş herbisitleri uygulayarak yabani otlarla savaşmalarını sağlar ve toprağı koruyan, erozyonu önleyen ve karbon salımlarını azaltan koruma toprak işleme üretim yöntemlerini kullanmalarını sağlar.

Hastalık direnci: Bitki yetiştiricileri genetik mühendislik sayesinde papaya ringspot virüsü (PRSV) gibi bitkilerin belli hastalıklara karşı koyabilmesini sağlayabilir. PRSV'ye dirençli olarak geliştirilen GD Rainbow Papaya, Hawaii papaya çiftçilerinin, endüstrilerini olumsuz etkileyen bu yıkıcı hastalığın patlamasından kurtulmalarına izin verir.

Besin içeriğinin geliştirilmesi ve diğer uygulamalar: Genetik modifiye soya fasulyesi, zeytinyağı gibi, bir yağ profiline sahip, daha uzun ömürlü olabilmektedir. Ayrıca ürün kesilirken veya işlenirken yüzeysel esmerleşmeyi ve çürümeyi (sadece patates) ortadan kaldırmak için patatesleri ve elmaları modifiye etmek için genetik mühendislik teknikleri kullanılmıştır. Bu özellikler üreticiler, işlemciler, perakendeciler ve tüketiciler tarafından atılan ürün miktarını azaltmaya yardımcı olabilir. Bazı biyoteknolojik mısır çeşitleri ise, selüloz ve / veya nişastanın parçalandığı ve yakıta dönüştürüldüğü prosesi iyileştirerek daha verimli biyo-yakıt üretimine olanak sağlar. Bu, biyoyakıt üretmek için gereken su, elektrik ve doğal gaz miktarını azaltarak üretim sürecinin çevresel etkilerini azaltmaya yardımcı olur.

2.6. Dünya Genelinde GD Özelllikler

Küresel bilgi paylaşım ağı olan Uluslararası Tarımsal Biyoteknoloji Uygulamalarının Sağlanması Servisi (ISAAA) veri tabanından sağlanan GD özellikleri aşağıdaki gibi sıralanabilir:

- 2,4-D Herbisit Toleransı
- Değişmiş Lignin Üretimi
- Anti-alerjik
- Antibiyotik Direnci
- Kınkanatlılar Böcek Direnci
- Geciktirilmiş Meyve Yumuşaması
- Geciktirilmiş Çürüme/Aşırı Olgunlaşma
- Dicamba Herbisit Toleransı
- Kuraklık Stres Toleransı
- Arttırılmış Fotosentez/Verim
- Üreme Verimi Arttırma
- Fungal Hastalık Direnci
- Glifosinat Herbisit Toleransı
- Glifosat Herbisit Toleransı
- Isoxaflutole Herbisit Toleransı
- Lepidopter (Kelebek, güve) Böcek Direnci
- Mannoz Metabolizması
- Mesotrione Herbisit Toleransı
- Modifiye Olmuş Alfa Amilaz

- Modifiye Aminoasit
- Modifiye Çiçek Rengi
- Modifiye Olmuş Yağ/Yağ Asitleri
- Modifiye Nişasta/Karbonhidrat
- Çoklu Böcek Direnci
- Nikotin Azaltımı
- Kahverengileşmeyen Fenotip
- Nopalin Sentezi
- Oxynil Herbisit Toleransı
- Fitaz Üretimi
- Azaltılmış Akrilamid Potansiyeli
- Siyah Nokta Azaltımı
- Sulfonylurea Herbisit Toleransı
- Viral Hastalık Direnci
- Görsel İşaretleyici
- Hacimce Odun Arttırımı özelliklerini görürüz.

Burada sıralanan özellikler sadece tek özelliğe sahip GDO'lar olmayıp yığın özellik gösteren GD çeşitleri de içermektedir. Her çeşit için tek bir özellik veya birden fazla özellikten söz edilebilir. Buna ek olarak özellik ismi aynı olsa da başka bir gen de aynı amaç ile kullanılabilir.

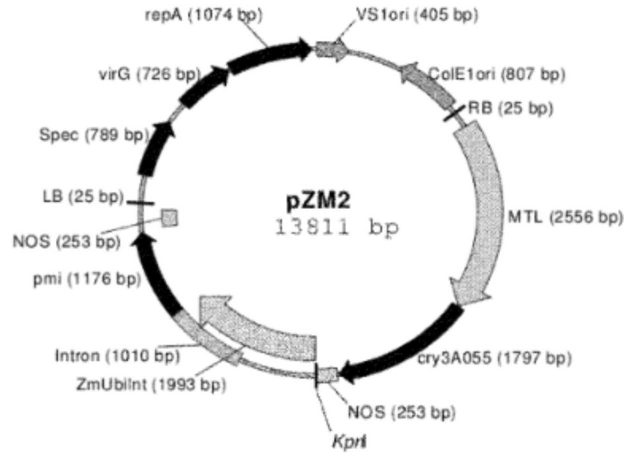
Bu çalışmada, GD çeşitleri MIR604 ve MON87701 GD çeşitleri konu edinilmiştir. MIR604, mısır kök kurduna karşı direnç kazandırılmış genetik modifiye mısır ticari ürünüdür. *Bacillus thuringiensis'* in Bt toksinini(Cry3A) kodlayan cry3A geni batı mısır kurdu (*Diabrotica virgifera virgifera*), kuzey mısır kök kurdu (*Diabrotica longicornis barberi*) ve benzer kınkanatlılar türlerine karşı koruma sağlar.

Escherichia coli bakterisinin pmi geni PMI proteinini üreterek mannozu karbon kaynağı olarak kullanımına olanak sağlamaktadır ve bu selektif işaretleyici olarak kullanılmaktadır. Bu çeşidin oluşmasındaki kullanılan modifikasyon tekniği Agrobacterium aracılığı ile sağlanan DNA transferidir[36].

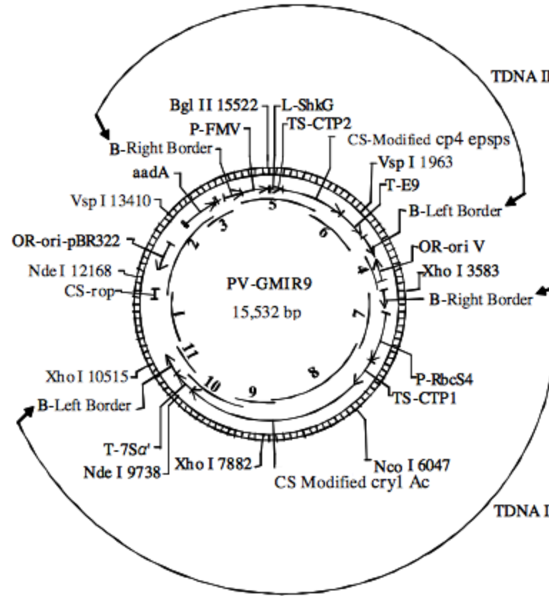
MON87701, birincil hedef bitki zararlısı *Anticarcia gemmatalis* , *Pseudoplusia includens* , *Epinotia aporema*, *Rachiplusia nu* gibi hedef lepidoptera, bitki zararlılarının beslenme zararından koruma sağlamak için bitkinin Cry1Ac proteininin insersiyonu ile modifiye edilmesine dayanır. Bu çeşidin

oluşmasındaki kullanılan modifikasyon tekniği Agrobacterium aracılığı ile sağlanan DNA transferidir[37].

GD çeşitlerinin geliştirildiği plazmidler Şekil 2.3 ve Şekil 2.4 arasında içerdiği elementler ise Tablo 2.2 ‘de verilmiştir.



Şekil 2.3. MIR604 Mısır geliştirmek için kullanılan pZM2 plazmid[38]



Şekil 2.4. MON87701 geliştirmek için kullanılan PV-GMIR9 plazmid [39]

Tablo 2.2. MON87701 soya ve MIR604 mısır genetik bileşenleri

	Kod	İsim	Tip	Promotör, diğer	Terminatör	Kopya	Form
R 6	mcry3A	Cry3A delta-	IR	*Zea mays* metallo-thionein benzeri genden elde edilen	*A. tumefaciens* nopalin sentaz (nos) 3'-çevrilmemiş	1	Mısırdaki gen ifadesini

		endotoxin		promotör	bölge		arttırmak için modifiye edilmiş
	pmi	mannose-6-phosphate isomerase	SM	ZmUbilnt (*Zea mays* poli-ubikuitin gen promotörü ve ilk intronu)	*A. tumefaciens* nopalin sentaz (nos) 3'-çevrilmemiş bölge	1	
MON87701	cry1Ac	Cry1Ac delta-endotoxin	IR	Promotör ve *A. thaliana* rbcS4 geninin (rubisco) 5' çevrilmemiş bölgesi Proteini kloroplasta hedeflemek için rbcS4 genin transit peptidi	Beta-conglycinin kodlama bölgesinin karboksil terminalinin 35 nükleotidi de dahil olmak üzere, Soya fasulyesi sphas1 geninin 3' bölgesi	1	

2.7. GDO'ların İzlenmesi, Etiketleme ve Risk Analizi

İzleme farklı otoriteler tarafından farklı tanımlanan geniş bir terimdir. ISO rehberi ISO 9000 (2005)' e göre izleme ürünün geçmişinin, uygulamasının veya yerinin belirlenmesi ile açıklanmıştır. Avrupa Birliği yasal düzenlemeleri (EC) 178/2002 'ye göre izlenme; gıda, yem, gıda üreticisi hayvan veya gıda ve yem içeriğine girmesi beklenen bir maddenin "üretim", "işleme" ve "dağıtım" esnasında izlenmesidir[40]. Codex Alimentarius Komisyonuna göre ise izleme gıdanın belirlenmiş üretim, işleme ve dağıtım aşamalarındaki hareketinin takip yeteneğidir.

Bu tanımlamalara göre izleme sistemi bize ürünün köken, işleme, perakende satışı esnasında ve son varış noktası hakkında bilgiler vermektedir [41]. Genetik olarak izleme ise; modifiye organizma/materyal veya ingrediyentin tip ve kökeni hakkında bilgi içeren genetik yapının izinin sürelebilmesi yeteneğidir [42].

GDO'ların izinin sürülebilmesinin amacı gönüllü olarak ve zorunlu olarak iki sınıfta toplanabilir [43]. Gönüllü olarak izleme amacı kalitenin açıklanması olarak düşünülebilirken, zorunlu izleme güven sınırına ilgi çekmek amacıyla yapılabilir.

GDO'larda izleme tohumun üretimi ile başlayıp paketleme işlemi ile sona erer. GD içermeyen başlangıç materyali veya GD içeren başlangıç materyali, tarımsal alanda, hasat sırası, transportasyon, depolama ve ham maddeden son ürüne dönüşüm aşamalarında iyi belgelenmelidir [44].

Piyasaya ilk GD ürünün sürülmesinden sonra ülkeler için, tüketici bilgilendirmesi amacıyla GDO'lar için risk değerlendirme ve etiketleme birçok ülkede zorunlu hale gelmiştir. Günümüzde, ülkelerin kendi ihtiyaçları doğrultusunda yasal düzenlemeleri ve GDO'lar için onay süreçlerinde farklılık söz konusudur. Yasal

düzenlemeler genellikle, başvuru, onaylanma ve GDO'ların piyasaya sürülmesi aşamalarını kapsamaktadır [45].

Bu bağlamda Amerika Birleşik Devletleri, Avrupa Birliği ve Türkiye'nin konuya bakış açıları ve yasal düzenlemelerinden kısaca bahsedilecektir.

Amerika Birleşik Devletleri'nde 3 bağımsız otorite GD bitkilerin yayılmasındaki yasal düzenlemerde rol oynarlar. Bunlar Hayvan ve Bitki Sağlığı Denetleme Servisi (APHIS), Gıda ve İlaç Yönetimi (FDA) ve Çevre Koruma Ajansı (EPA)'dır [45].

GDO'ların piyasaya sürülmesi ve üretiminin Türkiye'de sınırlamaları mevcuttur. Herhangi bir GDO'ya bitki veya ticari amaçlı onay verilmemektedir. Öte yandan yem olarak kullanımı sınırlandırılarak 26 adet mısır, 10 adet soya olmak üzere toplamda 36 GD çeşidi, ticareti için onaylanmıştır. Ürünler GDO içermese de depolama, transportasyon veya bir önceki üründen gelen kontaminasyonlar nedeni ile kalıntı DNA'lar saptanabilmektedir. Son düzenlemeler Avrupa Birliği yasal düzenlemelerinde olduğu gibi GDO'larda saptanma eşik değerini %0.9 olarak belirledi. Buradaki eşik değeri GD DNA kopya sayısının takson-spesifik DNA kopya sayısına bölünmesi ile veya hedef bitkinin kütle kesirinden yola çıkılarak yapılan hesaplamalarla anlaşılır.Bu amaçla, GDO'nun miktar analizinin yapılabilmesi için EC-JRM-IRMM değişik GD çeşitleri için Avrupa'da referans materyalleri üretmektedir.

Tablo 2.3. Türkiye'de yem olarak kullanımı onaylanan GD mısır çeşitleri [46]

GD Çeşidi Adı ve Kodu	Ticari İsmi
Mısır - *Zea mays L.* : 26 Çeşit	
Ad: 59122	Herculex™ RW
Kod: DAS-59122-7	
Ad: 59122 x NK603	Herculex™ RW Roundup Ready™ 2
Kod: DAS-59122-7 x MON-ØØ6Ø3-6	
Ad: Bt11 (X4334CBR, X4734CBR)	Agrisure™ CB/LL
Kod: SYN-BTØ11-1	
Ad: Bt11 x GA21	Agrisure™ GT/CB/LL
Kod: SYN-BTØ11-1 x MON-ØØØ21-9	
Ad: Bt11 x MIR604	Agrisure™ CB/LL/RW
Kod: SYN-BTØ11-1 x SYN-IR6Ø4-5	
Ad: GA21	Roundup Ready™ Maize, Agrisure™GT
Kod: MON-ØØØ21-9	

Ad: MIR162 Kod: SYN-IR162-4	Agrisure™ Viptera
Ad: MIR604 Kod: SYN-IR6Ø4-5	Agrisure™ RW
Ad: MIR604 x GA21 Kod: SYN-IR6Ø4-5 x MON-ØØØ21-9	Agrisure™ GT/RW
Ad: MON810 Kod: MON-ØØ81Ø-6	YieldGard™, MaizeGard™
Ad: MON810 x MON88017 Kod: MON-ØØ81Ø-6 x MON-88Ø17-3	YieldGard™ VT Triple
Ad: MON863 Kod: MON-ØØ863-5	YieldGard™ Rootworm RW, MaxGard™
Ad: MON863 x MON810 Kod: MON-ØØ863-5 x MON-ØØ81Ø-6	YieldGard™ Plus
Ad: MON863 x NK603 Kod: MON-ØØ863-5 x MON-ØØ6Ø3-6	YieldGard™ RW + RR
Ad: MON87460 Kod: MON-8746Ø-4	Genuity® DroughtGard™
Ad: MON88017 Kod: MON-88Ø17-3	YieldGard™ VT™ Rootworm™ RR2
Ad: MON89034 Kod: MON-89Ø34-3	YieldGard™ VT Pro™
Ad: MON89034 x MON88017 Kod: MON-89Ø34-3 x MON-88Ø17-3	Genuity® VT Triple Pro™
Ad: MON89034 x NK603 Kod: MON-89Ø34-3 x MON-ØØ6Ø3-6	Genuity® VT Double Pro™
Ad: NK603 Kod: MON-ØØ6Ø3-6	Roundup Ready™ 2 Maize
Ad: NK603 x MON810 Kod: MON-ØØ6Ø3-6 x MON-ØØ81Ø-6	YieldGard™ CB + RR
Ad: T25 Kod: ACS-ZMØØ3-2	Liberty Link™ Maize
Ad: TC1507 Kod: DAS-Ø15Ø7-1	Herculex™ I, Herculex™ CB
Ad: TC1507 x 59122 Kod: DAS-Ø15Ø7-1 x DAS-59122-7	Herculex XTRA™
Ad: TC1507 x 59122 x NK603 Kod: DAS-Ø15Ø7-1 x DAS-59122-7 x MON-ØØ6Ø3-6	Herculex XTRA™ RR

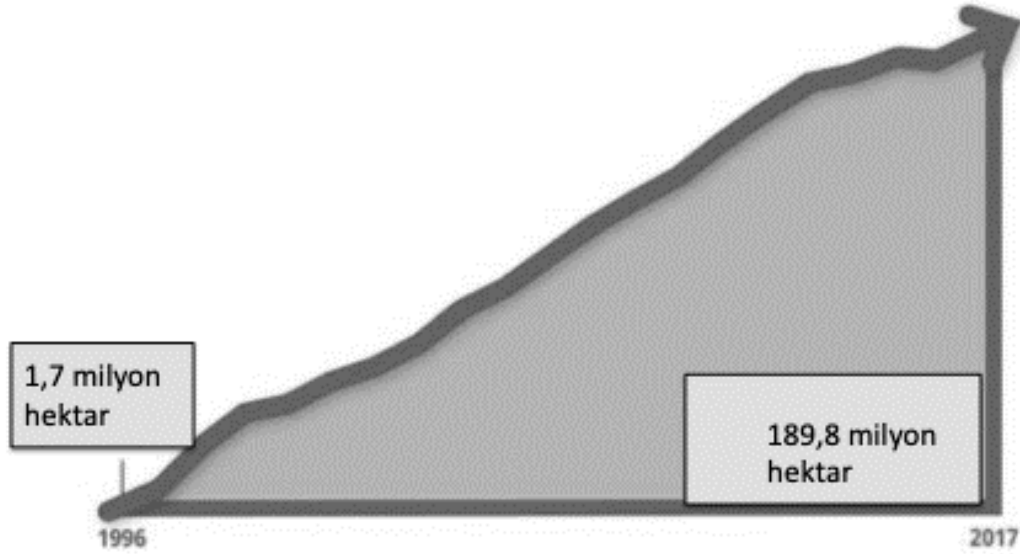
Ad: TC1507 x NK603 Kod: DAS-Ø15Ø7-1 x MON-ØØ6Ø3-6	Herculex™ I RR

Tablo 2.4. Türkiye'de yem amaçlı kullanımı onaylanan GD soya çeşitleri [46]

GD Çeşidi Adı ve Kodu	**Ticari İsmi**
Soya Fasülyesi - *Glycine max L. :* 10 Çeşit	
Ad: A2704-12 Kod: ACS-GMØØ5-3	Liberty Link™ soybean
Ad: A5547-127 Kod: ACS-GMØØ6-4	Liberty Link™ soybean
Ad: CV127 Kod: BPS-CV127-9	Cultivance
Ad: DP356043 Kod: DP-356Ø43-5	Optimum GAT™
Ad: GTS 40-3-2 (40-3-2) Kod: MON-Ø4Ø32-6	Roundup Ready™ soybean
Ad: MON87701 Kod: MON-877Ø1-2	not available
Ad: MON87701 x MON89788 Kod: MON-877Ø1-2 x MON-89788-1	Intacta™ Roundup Ready™ 2 Pro
Ad: MON87705 Kod: MON-877Ø5-6	Vistive Gold™
Ad: MON87708 Kod: MON-877Ø8-9	Genuity® Roundup Ready™ 2 Xtend™
Ad: MON89788 Kod: MON-89788-1	Genuity® Roundup Ready 2 Yield™

GD bitkiler 1996'dan beri 28 ülkede ekilmektedir. ABD bu konuda lider durumdadır. Buna ek olarak, yasalar dahilinde GD bitkiler 40 ülkede ticari olarak kullanılmaktadır.

Ticari olarak kullanılan biyoteknolojik bitkilerin 21 yaşına girdiği 2017 yılında 24 ülke tarafından 189.8 milyon hektar biyoteknolojik bitki 17 milyona yakın çiftçi tarafından ekilmiştir. 1996'daki 1.7 milyon hektarlık arazi 2017 yılında 112 kat artmıştır (Şekil 2.5). Bu nedenle modern tarım tarihinde biyoteknolojik bitkiler en hızlı adapte olunan bitki teknolojisi olarak düşünülmektedir [47].



Şekil 2.5. 1996’ dan 2017’ye küresel çapta biyoteknolojik bitki ekili alan [47]

Tablo 2.5. Küresel çapta biyoteknolojik bitki alanlarının 1996-2017 değişimi [47]

Yıl	Hektar (Milyon)	Akre (Milyon)
1996	1,7	4,3
1997	11,0	27,5
1998	27,8	69,5
1999	39,9	98,6
2000	44,2	109,2
2001	52,6	130,0
2002	58,7	145,0
2003	67,7	167,2
2004	81,0	200,0
2005	90,0	222,0
2006	102,0	250,0
2007	114,3	282,0
2008	125,0	308,8
2009	134,0	335,0
2010	148,0	365,0
2011	160,0	395,0

2012	170,3	420,8
2013	175,2	433,2
2014	181,5	448,0
2015	179,7	444,0
2016	185,1	457,4
2017	189,8	469,0
Toplam	2339,5	5780,0

2011- 2016 yılları arasındaki verilere göre gelişmekte olan ülkelerin biyoteknolojik bitki ekimi gelişmiş ülkelerden daha fazlaydı. 2016 yılında 19 gelişmekte olan ülke %54 ile 99.6 milyon hektar biyoteknolojik bitki ekerken 7 gelişmiş ülke %46 ile 85.5 milyon hektar biyoteknolojik bitki ekmiştir.

2016 yılında biyoteknolojik bitkileri eken 26 ülkeden 18'i en azından 50,000 hektar büyüyen biyoteknolojik mega ülkeler oluşturmaktaydı. 2016 yılında ABD 72.9 milyon hektar ile toplam üretimin %39'unu oluşturarak uluslararası anlamda en iyi üretici olarak yerini almıştır. Breziya 2. sırayı 49.1 milyon hektar ile toplam ekimin %27'sini karşılaması ile almıştır. Ayrıca Brezilya 2015'den 2016 yılına %4.9 bitkilerdeki artış ile en yüksek biyoteknolojik artışına sahip ülke olmuştur.

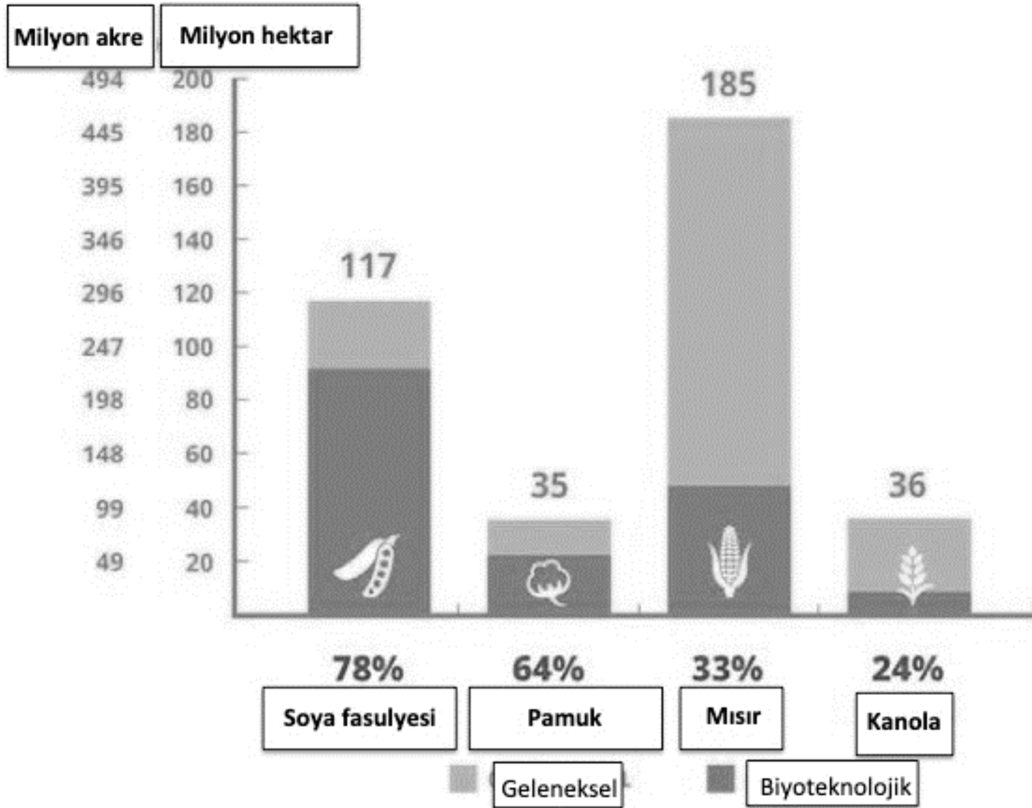
Tablo 2.6. 2015-2016 yılları arasında ülkelerin biyoteknolojik bitki tarım alanı değişimleri

Sıralama	**Ülke**	**2015**	**2016**
1	Amerika*	70,9	72,9
2	Brezilya*	44,2	49,1
3	Arjantin*	24,5	23,8
4	Kanada*	11	11,6
5	Hindistan*	11,6	10,8
6	Paraguay*	3,6	3,6
7	Pakistan*	2,9	2,9
8	Çin*	3,7	2,8
9	Güney Afrika*	2,3	2,7
10	Uruguay*	1,4	1,3
11	Bolivya*	1,1	1,2

12	Avustralya*	0,7	0,9
13	Filipinler*	0,7	0,8
14	Myanmar*	0,3	0,3
15	İspanya*	0,1	0,1
16	Sudan*	0,1	0,1
17	Meksika*	0,1	0,1
18	Kolombiya*	0,1	0,1
19	Vietnam	<0,1	<0,1
20	Honduras	<0,1	<0,1
21	Şili	<0,1	<0,1
22	Portekiz	<0,1	<0,1
23	Bangladeş	<0,1	<0,1
24	Kostarika	<0,1	<0,1
25	Slovakya	<0,1	<0,1
26	Çek Cumhuriyeti	<0,1	<0,1
	Toplam	**181,5**	**179,7**

Yıldız işareti "*" ile gösterilenler 50,000 hektar veya daha fazla büyüyen biyoteknolojik mega ülkeleridir [48]

2016 yılında en fazla ekilen biyoteknolojik bitki soya fasülyesi, mısır, pamuk ve kanolaydı. 2016 yılı verilerine göre 91.4 milyon hektar soya fasülyesi ekili alanı bulunmaktaydı ve bu da dünya çapında toplam ekili soya alanının %78'ini oluşturmaktadır (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Dünya çapında üretilen biyoteknolojik bitkilerin toplam bitkilere göre yüzdesi [48]

Tablo 2.7. Ülkeler ve onaylanmış ticari olarak kullanılan GDO'lar [48]

Ülkeler ve Onaylanmış GDO'ların sayısı		
Arjantin(62 Çeşit)	Avrupa Birliği(104 Çeşit)	Paraguay(22 Çeşit)
Avustralya(130 Çeşit)	Honduras(8 Çeşit)	Filipinler(88 Çeşit)
Bangladeş(1 Çeşit)	Hindistan(11 Çeşit)	Rusya(12 Çeşit)
Bolivya(1 Çeşit)	Endonezya(18 Çeşit)	Singapur(33 Çeşit)
Brezilya(72 Çeşit)	İran(1 Çeşit)	Güney Afrika(70 Çeşit)
Burkina Faso(1 Çeşit)	Japonya(308 Çeşit)	Güney Kore(164 Çeşit)
Kanada(179 Çeşit)	Malezya(41 Çeşit)	Sudan(1 Çeşit)
Şili(3 Çeşit)	Meksika(170 Çeşit)	İsviçre(4 Çeşit)
Çin(64 Çeşit)	Myanmar(1 Çeşit)	Tayvan(136 Çeşit)
Kolombiya(94 Çeşit)	Yeni Zellanda(104 Çeşit)	Tayland(15 Çeşit)
Kosta Rika(20 Çeşit)	Norveç(11 Çeşit)	Türkiye(36 Çeşit)
Küba(1 Çeşit)	Pakistan(2 Çeşit)	ABD(198 Çeşit)
Mısır(1 Çeşit)	Panama(1 Çeşit)	Uruguay(17 Çeşit)

		Vietnam(22 Çeşit)

Tablo 2.8. 2015-2016 yılları arasında GD ekili alanların değişim oranları[48]

	Ülke	**2015**	**%**	**2016**	**%**	**(+ / -)**	**%**
1	Amerika*	70,9	39	72,9	39	2, 0	3
2	Brezilya*	44,2	25	49,1	27	4, 9	11
3	Arjantin*	24,5	14	23,8	13	-0,7	-3
4	Kanada*	11	6	11,6	6	0,6	5
5	Hindistan*	11,6	6	10,8	6	-0,8	-7
6	Paraguay*	3,6	2	3,6	2	0	0
7	Pakistan*	2,9	2	2,9	2	0	0
8	Çin*	3,7	2	2,8	2	-0,9	-24
9	Güney Afrika*	2,3	1	2,7	1	0,4	17
10	Uruguay*	1,4	1	1,3	1	-0,1	-7
11	Bolivya*	1,1	1	1,2	1	0,1	9
12	Avustralya*	0,7	<1	0,9	<1	0,2	29
13	Filipinler*	0,7	<1	0,8	<1	0,1	14
14	Myanmar*	0,3	<1	0,3	<1	0	0
15	İspanya*	0,1	<1	0,1	<1	0,1	0
16	Sudan*	0,1	<1	0,1	<1	0,1	0
17	Meksika*	0,1	<1	0,1	<1	0,1	0
18	Kolombiya*	0,1	<1	0,1	<1	<0,1	<0,1
19	Vietnam	<0,1	<1	<0,1	<1	<0,1	<0,1
20	Honduras	<0,1	<1	<0,1	<1	<0,1	<0,1
21	Şili	<0,1	<1	<0,1	<1	<0,1	<0,1
22	Portekiz	<0,1	<1	<0,1	<1	<0,1	<0,1
23	Bangladeş	<0,1	<1	<0,1	<1	<0,1	<0,1
24	Kostarika	<0,1	<1	<0,1	<1	<0,1	<0,1
25	Slovakya	<0,1	<1	<0,1	<1	<0,1	<0,1
26	Çek Cumhuriyeti	<0,1	<1	<0,1	<1	<0,1	<0,1
27	Burkina Faso	0,5	<1	-	-	-	-
28	Romanya	<0,1	<1	-	-	-	-
	Toplam	179,7	100	185,1	100	5,4	3,0

Yıldız işareti “*” ile gösterilen 50,000 hektar veya daha fazla

Günümüzde rekombinant DNA teknolojisi Amerika, Arjantin, Brezilya, Kanada, Çin ve Avustralya gibi ülkeler tarafından tarım alanında sıklıkla kullanılmaktadır. Onaylanıp piyasaya sürülen ilk GD bitki olan Flavr Savr 1994 yılında raf ömrünün uzatıldığı domates olmuştur. Güncel dökümanlara göre, 498 GD çeşidi gıda ve yem üretimi için 40 ülke tarafından onaylanmıştır. ISAAA verilerine göre GD bitkiler 1996'dan beri aktif olarak ekilmektedir.

Çoğu ülkenin gıda ve yem amacıyla GD bitkileri onaylamasına karşın gıda güvenliği, çevresel risk ve etik kaygılar gıda ve yem ürünlerinde GDO'dan türetilen ürünlerin izinin sürülebilmesi için etiketlenmesini doğurmuştur. Ülkelerin kendi yasal düzenlemeleri gereğince de etiketleme ülkeler ve şirketler arası çatışmalara ve yanlış anlaşılmalara sebebiyet vermemesi için GDO'lar ile ilgili en önemli konulardan olmaktadır. GDO ile ilgili ilk etiketleme düzenlemeleri 1997 yılında Avrupa Birliği tarafından yapılmıştır. O zamandan beri 64 ülke GDO'lar hakkında etiketleme ve izlenebilirlik ile ilgili düzenlemeler yaptı. Etiketleme düzenlemeleri temelde 2 grupta incelenebilir. Bunlar zorunlu ve gönüllü etiketlemedir. Zorunlu ve gönüllü etiketleme tipi ve eşik değeri ülkeden ülkeye yasal sistemleri dahilinde değişir. Bu nedenle, GDO'lar hakkında etiketleme, izlenebilirlik ve eşik değer için küresel anlamda ortak bir düzenleme söz konusu değildir [48].

GDO'lar hakkında risk analizi stratejileri son zamanlarda bir çok ülke tarafından tanımlandı. İlk olarak Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü (OECD), 1993 yılında GD gıda ve yemlerde risk değerlendirmesi için bir prensip öne sürdü. Daha sonra Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) ve Birleşmiş Devletler Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından Codex Alimentarius Komisyonu risk değerlendirme konusunda doküman yayınlandı. Codex Alimentarius Komisyon'unda “Modern Biyoteknolojik Yöntemler Kullanılarak Elde EdilenGıdaların Risk Analizi ilkeleri”, “Rekombinant DNA Bitkilerden elde edilen Gıdalar için Biyogüvenlik Değerlendirmesi Rehberi“ ve “Rekombinant DNA mikroorganizmalardan elde edilen Gıdalar için Biyogüvenlik Değerlendirmesi Rehberi” gibi gıda standartları ve rehber kaynaklar 2003 yılında geliştirilmiştir.

Bundan sonra 2001 yılından itibaren Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) GD gıda ve yemler için risk analizini değerlendirmiştir [49]. EFSA; ürünlerin onay verilmesinde, denetim ve kontrol aşamalarında karar alan AB üye

ülkelerine GDO'ların risk değerlendirmesi konusunda bağımsız bilimsel danışman görevini sürdürüyor [50].

Risk değerlendirmesi dört aşamada gerçekleştirilmektedir. Bunlar; olumsuz etkiler yaratabilecek özelliklerin tespit edilmesi, bu olası özelliklerin sonuçlarının değerlendirilmesi, meydana çıkış ihtimallerinin belirlenmesi, GD ürünlerle ilgili saptanan her bir özelliğin oluşturduğu riskin tahmini olarak hesaplanmasından oluşmaktadır.

GDO'ların risk değerlendirmesi aşamasında aşağıda belirtilen bazı hususların hesaba katılması gerekmektedir:

- GD bitki ve ilgili ürüne ait yapılması gereken kapsamlı tanımlar, GD bitki oluşturulması sırasında kullanılan genetik modifikasyon yöntemi,
- Alıcı bitkinin kapsamlı tanımı ve gıda maddesi olarak kullanımı hakkında bilgiler,
- Alıcı bitkinin yetiştirilme, ıslah, gelişim koşulları ve varsa bu bitkinin toksik ya da alerjik etkileri hakkında bilgiler,
- Verici organizmaların kapsamlı tanımı ve bu organizmaların olası toksik ve alerjik etkileri,
- Nükleik asit dışındaki ifade edilen maddelerin olası toksisite durumunun incelenmesi ve verici organizmadan toksik bileşenlerinin aktarılıp aktarılmadığını tespit etmeye yönelik bir değerlendirme yapılması.
- Temel bileşenlerin kompozisyonel analizi, alıcı bitkinin ve yeni bitkinin temel bileşenlerinin OECD'nin öne sürdüğü büyük ölçüde eşdeğerlik kavramına uygun şekilde karşılaştırılarak incelenmesi,
- Temel bileşenlerin doğal varyasyonlarının incelenmesi,
- GD bitkinin metabolitlerin değerlendirilmesi,
- Gıda işleme sonrasında GD gıda maddelerindeki metabolit ya da bileşen profili üzerine etkilerin araştırılması,
- Yeni bir temel besleyici bileşen hedeflenmesi durumunda besin değeri araştırılması gerekmektedir [51].

Türkiye Biyogüvenlik Kanunu 5977 No'lu Yasaya göre risk yönetimi; "GDO ve ürünlerinin, risk değerlendirmesi ve yasal faktörler göz önünde tutularak ilgili taraflarla istişare ile onaylanan amaç ve kurallar dâhilinde kullanılmasını ve muamelesini sağlamak amacıyla alınan önlemleri, uygun olabilecek

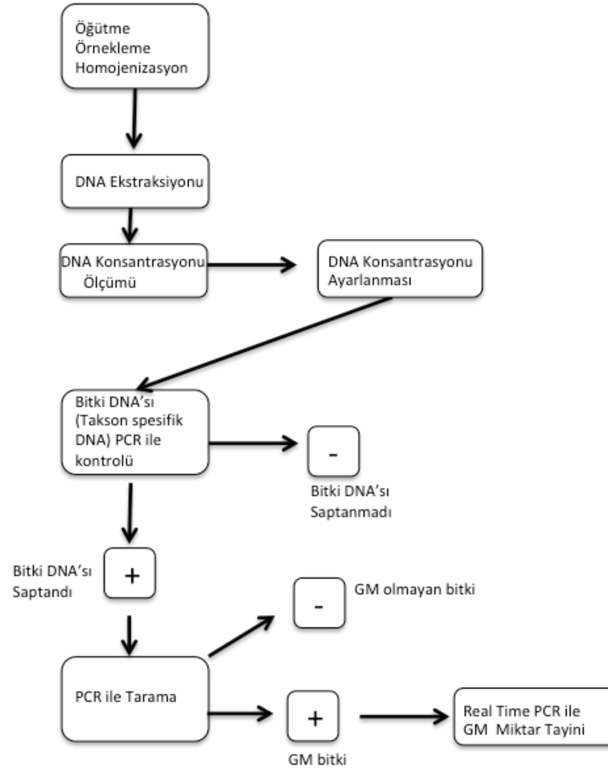
kontrol önlemlerine ilişkin alternatiflerin değerlendirilmesi, tercih edilmesi ve uygulanmasını kapsayan süreç" olarak ifade edilmektedir.

Risk iletişimi; risk değerlendirmesi ile risk yönetiminin birlikte değerlendirilmesi olarak düşünülebilir. Türkiye Biyogüvenlik Kanunu 5977 No'lu yasasında bu tanım; "risk analizi sürecinde risk değerlendiricileri, risk yöneticileri ve diğer ilgili tarafların, tehlike, risk, riskle ilgili faktörler ve riskin algılanmasına ilişkin bilgi ve görüşler ile risk değerlendirmesi bulguları ve risk yönetimi kararlarının açıklamalarını da kapsayan bilgi ve düşüncelerin paylaşımını içermektedir" şeklinde yapılmıştır.

Risk değerlendirmesi 11 kişiden oluşan bilimsel risk değerlendirme komitesi tarafından değerlendirilmektedir. Değerlendirilen rapor gizli değildir ve resmi gazetede yayınlanmaktadır. Risk yönetimi için, karar mercii tarafından risk değerlendirmesi raporunun değerlendirme süreci olarak düşünülebilir.

2.8. GDO Tespitinde Analitik Metotlar

Analitik GDO saptama ve miktar tayini stratejisi örnekleme ve örnek hazırlanması ile başlamaktadır. Saptama prosedürü nükleik aside yada proteine dayalı olmak üzere iki gruba ayrılabilir [52]. Nükleik aside dayalı GDO nitel ve nicel analiz akış şeması Şekil 2.7.'de şematize edilmiştir.



Şekil 2.7. GDO saptama ve miktar tayini analiz akım şeması

2.8.1. Proteine Dayalı GDO Saptanması

Proteine dayalı saptama yöntemleri protein-antikor ilişkisinin kromojenik reaksiyonuna dayanır ve immünolojik test olarakda adlandırılabilir. Kromojenik reaksiyonlar ikincil reaksiyon olsalarda reaksiyon karışımındaki hedef proteinin gözlemlenebilmesi için protein-antikor etkileşimi kadar önemlidir. GDO'larda yabancı proteinin doğru ve geçerli bir şekilde tanımlanabilmesi, o proteinin antikorurunun analiz için elimizde bulunması ile mümkündür. Yatay akış çubukları(Lateral Flow Sticks) ve plakaya dayalı immüno enzimatik yöntem(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) GDO'ların saptanmasında en çok kullanılan proteine dayalı yöntemlerdir.

Proteine dayalı metotlar tarla ve hasat sırasında hızlı GDO saptanmasına olanak sağlarlar. Fakat işlenmiş matrislerde hedef protein degrade olduğundan proteine dayalı yöntemler bu alan için uygun değildir [32].

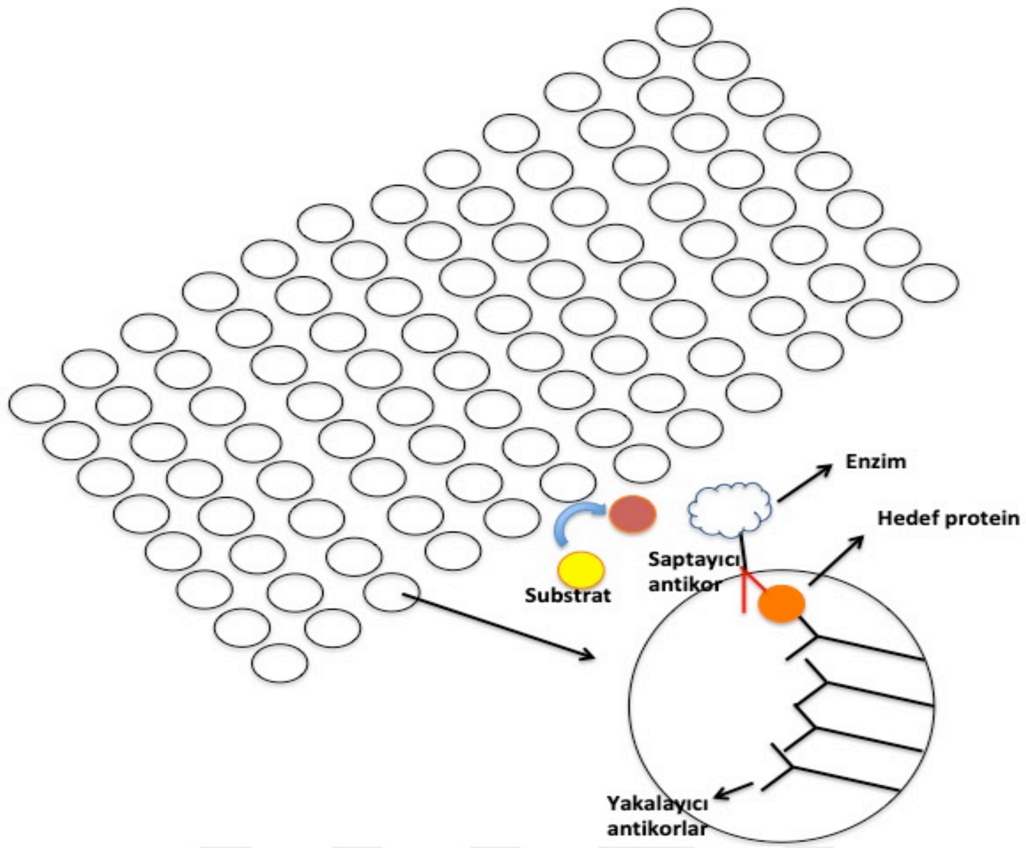
2.8.1.1. ELISA Yöntemi

ELISA GDO saptanmasında moleküler tanı yöntemidir. Bu yöntem de diğer proteine dayalı yöntemlerde olduğu gibi antijen-antikor ilişkisine dayanmaktadır

[53]. Antijen ve antikor arasıdaki enzimatik reaksiyon çoklu kovalent olmayan etkileşimler olduğundan kararlı bir kompleks oluşturur [54].

ELISA, 96 kuyucuklu bir plakada reaksiyonunu gerçekleştiren plakaya bağlı bir sistemdir [49]. ELISA doğrudan ve dolaylı protokol olmak üzere 2 grupta toplanabilir. Dolaylı ELISA genellikle antikor tanınması ile GDO tespitini gerçekleştirirken, doğrudan ELISA ie genellikle antijen tanıması yolu ile GDO tespitine olanak verir. Doğrudan ELISA protokolü GDO saptanmasında daha sık tercih edilen protokoldür [44]. Dolaylı ELISA protokolünde antijen kuyucuğa bağlanırken, doğrudan ELISA protokolünde yakalayıcı antikor kuyucuğa bağlıdır. Bağlanmayan protein antijen yada antikordan uzaklaştırılması için her ek basmakta yıkama aşaması
bulunmaktadır [55]. Kuyucuğa substrat eklenmesi ile birlikte kuyucukta kromojenik reaksiyon meydana gelerek renksiz olan çözelti başlangıç çözeltisindeki hedef antijen konsantrasyonuna bağlı olarak farklı tonlarda mavi renge dönüşür. Bu nedenle GD konsantrasyonun buradaki reaksiyona göre belirlenmesi için gerekli olan standart eğri çizimi için bir de referans proteine ihtiyaç duyulmaktadır. Renk değişimi mikroplaka okuyucu ile okunmaktadır [56]. Bu metot yarı kantitatiftir.

ELISA yönteminde kullanılan antikorlar GD protein antijenlerine çok spesifik olmalıdır. Hedef organizmadan izole edilen antijenin saflığı %75'in üzerinde olmalıdır [43]. ELISA metodu mekanizmasının kuyucuklu plakalarda gösterimi Şekil 2.8. ' deki gibidir[57].



Şekil 2.8. ELISA metodu mekanizmasının kuyucuklu plakalarda gösterimi

2.8.1.2. Yatay Akış Çubukları (Lateral Flow Strips)

Yatay akış çubukları membrana dayalı bir saptama yöntemidir[58]. Yatay akış çubukları 2 yakalama çizgisi olan kağıt çubuk yada plastik paletlerden yapılır. Bunlardan birincisi transgenik proteini yakalar ve ikincisi kromojenik reaksiyon için gerekli olan substratı yakalar. Yatay akış çubuğu protein karışımı bulunan örneğe bandırıldığında çözeltideki antijenlerin, antikor bulunan çubuklara kapiler hareket ile göçü söz konusudur. İlgilenilen antijenin birikimi çizgilerde antijen antikor bağlanmasını gösteren renk değişimi ile sonuçlanır. Fakat proteinin miktarı bu teknik ile tam olarak bilinemez ve bu yüzden yarı- kantitatif bir metottur.

2.8.2. Nükleik Aside Dayalı GDO Tespiti

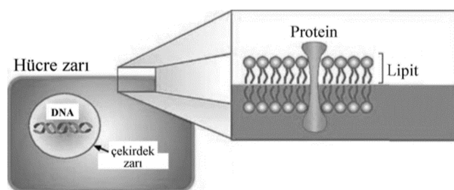
2.8.2.1. DNA ekstraksiyonu

Nükleik aside dayalı GDO tespiti için ilk aşama DNA ekstraksiyonu aşamasıdır. Genomik DNA izolasyonu, ekstraksiyon ve saflaştırma yöntemlerinden oluşan bir işlemdir. Nükleik asitlerin ekstraksiyonu seçilecek olan fiziksel, kimyasal veya enzimatik yöntem sonrası hücre parçalanması, hücre nükleazların

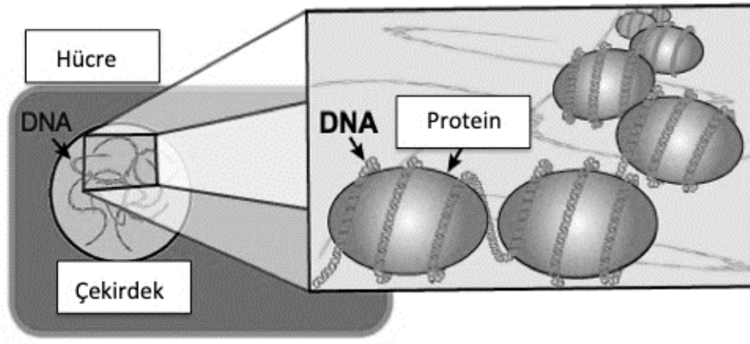
inaktivasyonu ve nükleik asitlerin parçalanmış hücreden saflaştırılması aşamalarından oluşmaktadır. Bu aşamada kullanılacak prosedür doku gibi bir başlangıç materyalini parçalayacak kadar sert, hedef nükleik asidi koruyacak kadar da yumuşak olmalıdır. Ekstraksiyon esnasında öğütme ve hipotonik parçalama gibi mekanik parçalama yöntemleri, deterjan kullanılarak parçalama, kaotropik katkı maddeleri, tiol ile redükleme gibi kimyasal uygulamalar ve proteinaz K gibi enzimlerin kullanıldığı enzimatik parçalama olmak üzere 3 ana başlık altında toplanabilmektedir.

Hücre membranının parçalanması ve hücre içi nükleazların inaktivasyonu bazı prosedürlerde birleştirilmektedir. Böyle bir durumda bir çözelti hücre membranını parçalamak için deterjan içerirken hücre içi enzimleri inaktive edilmesinde de güçlü kaotropik tuzlar içerebilir. Hücrenin lizize uğraması ve nükleaz inaktivasyonundan sonra hücre içerisindeki diğer faktörlerin uzaklaştırılması filtrasyon veya presipitasyon(çökeltme) ile kolayca yapılabilir.

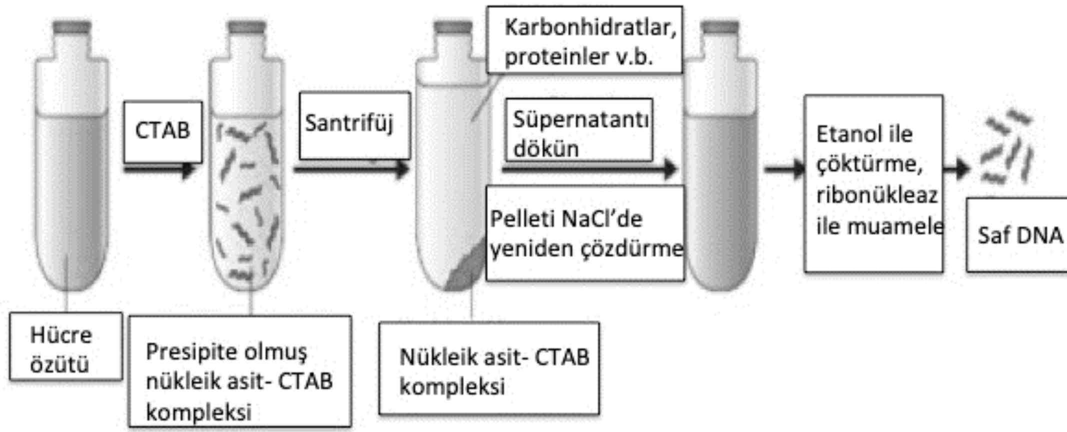
Nükleik asitlerin saflaştırılmasında genellikle ekstraksiyon/presipitasyon, santrifügasyon, kromatografi, afinite kolon ayrımı gibi yöntemler mevcut olmak ile birlikte bu yöntemler etkin bir saflaştırma işlemi için birleştirilebilmektedir [59]. Nükleik asitlerden kontaminantları uzaklaştırmak için ekstraksiyon/presipitasyon yönteminde çözücü ekstraksiyonu yaygın kullanılan bir yöntemdir. Bu gibi durumlarda amaç proteinlerin uzaklaştırılması ise fenol ve kloroform kombinasyonu, bu aşamadan sonra nükleik asitlerin konsantre edilmesinde de izopropanol ve etanol ile presipitasyon bu kapsamda yaygın olarak kullanılan kimyasallardır. Bu metot dışında yüksek konsantrasyonlu tuz (salting out) veya pH'daki değişikliklerin kullanılmasına dayanan seçici presipitasyon da kullanılan diğer yöntemlerdendir [59]. Hücre membranı, çekirdek, DNA gösterimi Şekil 2.9 ve Şekil 2.10 ' da gösterilmiştir[60,61]. CTAB' e dayalı presipitasyon yöntemi ile DNA ekstraksiyonu aşamaları ise Şekil 2.11 ' de verilmiştir[62].



Şekil 2.9. Hücre membranı basit gösterimi



Şekil 2.10. Çekirdek içindeki DNA gösterimi



Şekil 2.11. DNA izolasyonunda CTAB ekstraksiyonu aşamaları

2.8.2.1. DNA Mikrodizi (Microarray)

DNA çipi olarakda adlandırılan mikrodiziler, bir reaksiyonda çoklu hedef dizilerini tanıyıp analiz eden moleküler biyoloji aracıdır [63]. DNA çipi prob olarak adlandırılan spesifik DNA dizileri içeren mikroskobik DNA noktalarıdır. Problar hedef dizisinin tamamlayıcısı olan kısa DNA parçaları olup cam yüzeye veya silikon çipe tutturulurlar. Hedef dizi florofor veya kemiluminans ile işaretlenir. DNA mikrodizileri florofor veya kemiluminans işaretli hedeflerin prob-hedef DNA hibridizasyonu ile saptanmasına dayanan bir metottur. DNA mikrodizileri gen keşfi, hastalık tanısı, ilaç keşfi, toksikolojik çalışmalar ve GDO saptanması konusunda oldukça kullanışlıdır. Bu teknolojinin dezavantajı oldukça pahalı olmasıdır.

2.8.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Metodu

Karry M. Mullis tarafında 1983 yılında icat edilen PCR tek bir kopya DNA'dan fazla sayıda DNA elde etmeye olanak veren bir tekniktir. 1983'ten itibaren PCR moleküler biyoloji araştırmaları ve biyoteknoloji uygulamaları için en önemli araçlardan olmuştur. PCR hedef DNA dizisini in vitro koşullarda çoğaltan basit bir tekniktir. Ana bileşenleri olarak:

-çoğaltılacak olan hedef DNA,

-tek iplikli oligonükleotitler (ileri ve geri primerler)

-hedef DNA'nın tamamlayıcı serbest 3' OH grubu,

-ısıya dayanıklı DNA polimeraz,

-DNA polimerazın koenzimi olan Mg^{2+} ,

-fazla miktarda serbest deoksiribonükleotit trifosfatlar (dATP, dCTP,dTTP, dGTP) ile

-RNaz ve DNaz içermeyen duble distile suyu sayabiliriz [64].

PCR DNA'nın denatürasyon, yapışma ve uzama olmak üzere 3 ana basamaktan oluşan ısı dögüsü ile yürütülür. İlk olarak PCR' da denatürasyon basamağı gerçekleşir. Bunun ardında yatan fikir, çift iplikçikli DNA'nın hidrojen bağlarının kırılmasını sağlayarak DNA'nın açılıp tek zincirli hale getirmektir. Burada yüksek sıcaklıkta yeterli zamana maruz kalınması ile hidrojen bağlarının yıkımı gerçekleşebilir. Denatürasyon sıcaklığı yaklaşık 90-94°C dir. İkinci olarak bağlanma aşaması primerlerin şablon DNA'ya bağlanması aşamasını içermektedir. Primerlerin de bağlanma sıcaklığı uygulanılacak hedef DNA dizisine göre değişmektedir. Bir PCR'da en değişken parametre primerlerdir. Primerlerin bağlanma sıcaklığına göre ilk aşama olan denatürasyon sıcaklıklarından bağlanma sıcaklığına kadar bir iniş gerekmektedir. Primerlerin bağlanma sıcaklığı erime sıcaklığından yaklaşık 5°C düşük olmalıdır. Eğer bağlanma sıcaklığı erime sıcaklığından fazla ayarlanırsa şablon DNA ile arasında hidrojen bağları oluşmaz ve eğer bağlanma noktası erime noktasından oldukça düşük ayarlandıysa da bu sefer spesifikliği düşük bağlanmalar meydana gelebilmektedir. PCR'daki üçüncü aşama ise uzama olarak bilinir. Bu aşamada DNA polimerazın optimum çalışması için gerekli olan sıcaklık ve süre parametreleri ayarlanmalıdır. Burada DNA polimeraz kullanılarak her bir şablon DNA üzerinden 2 adet DNA sentezlenecektir. Uzama aşaması ile birlikte komşu nükleotitler arasında fosfodiester bağları kurulur. 3' OH grubu ilk fosfodiester

bağının kurulması amacı ile oldukça önemlidir. Burada bulunan 3’ OH grubu DNA polimeraz için sinyal işlevi görür ve bu bölgeden başlayarak DNA’ yı uzatmaya başlar. DNA polimeraz doğru nükleotidi uygun uzaklığa yerleştirerek bağ oluşumunu sağlar. Bu aşamada primerlerin bağlanma sıcaklığından sonra bir yükseliş gerçekleşir bu yükseliş DNA polimerazın çalışacağı optimum sıcaklık olan 70 ile 80°C arasında bir değerdir. Bu değer kullanılan DNA polimeraza göre değişmektedir. Yaygın olarak kullanılan Taq Polimeraz için optimum sıcaklık 72°C dir. Normalde proteinler ısıya dayanıklı değillerdir ve PCR için kullanılacak olan DNA polimerazlar termofilik bakteri yada fungiden izole edilmelidir. Aynı şekilde PCR esnasında oldukça geniş bir aralıkta sıcaklık dalgalandığından DNA polimeraz ısıya karşı dayanıklı olup yüksek sıcaklıklarda denatüre olmamalıdır. Taq polimeraz dışında diğer kullanılan bazı polimerazları Pfu, Vent, Deep Vent ve Ultma olarak sıralayabiliriz [65].

Buradaki 3 basamak 1 döngü oluşturur. Bu döngüler genellikle 1’den 45’e kadar gitmektedir. Eğer döngü sayısı 45’den fazla ise DNA polimeraz ısıya dayanıklı olsa bile DNA sentezi aktivitesini kaybetmeye başlar. Her bir döngü ile hedef DNA 2’ye bölünerek eksponensiyel bir artış sergileyecektir. Hedef DNA’nın kopya numarası n_ox2C(n_o : Şablon DNA’nın başlangıçtaki sayısı C: PCR’daki döngü sayısı) olarak hesaplanabilmektedir.

PCR’ın icadından sonra bu yöntem farklı şekillerde modifiye edilmiştir. Bunlardan bazıları:

-Konvensiyonel PCR

-Ters Transkriptaz PCR

-Kantitatif Eş Zamanlı PCR

-Dijital PCR

-İçiçe PCR(Nested)

-Çoklu PCR (Multiplex)

-Hot Start PCR

-In situ PCR

-Ters PCR (Inverse) olarak sıralanabilir.

PCR uygulamaları genel olarak GDO analizleri, tarımsal alanlarda, adli alanlarda ve tıp olmak üzere geniş alanlarda görülür.

2.8.2.3. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR, Q-PCR)

Higuchi ve arkadaşları tarafından Q-PCR 1993 yılında geliştirilmeye başlandı. Yaklaşımları kinetik PCR olarak adlandırıldı. DNA'nın çift zincirli olduğu anlarda ışık yayan interkalatlayıcı bir boya olan Etidyum Bromid kullanarak her PCR döngüsünde çoğalan DNA'yı görselleştirdiler. Öte yandan EtBr spesifik olarak çift heliks DNA'ya bağlanmadığından primer dimerleri, spesifik olmayan amplikonlarda floresan ışığa katkı sağlayacaklarından kesinliği olmayan sonuçlara sebebiyet verir [66]. Florojenik probların geliştirilmesi ile analizlerde kesinlik sağlandı ve yeni jenerasyon PCR platformları ve kimyasalların çıkmasına neden olmuştur. Yeni jenerasyon PCR platformunda her döngü sonunda biriken DNA miktarı eş zamanlı olarak görselleştirilebiliyordu. 1996 yılında ilk ticari Q-PCR Applied Biosystems ABI Prism 7700 Sequence Detection adı altında piyasaya sürülmüştür. Otomatikleşen Q-PCR cihazının ticari olarak piyasaya sürülmesinin ardından SYBR Green, TaqMan, Scorpion ve Molecular Beacon gibi farklı uygulamalar geliştirilmiştir.

Eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yönteminin, tekrarlanabilir, verimli, özgül ve hassas olması nedenleriyle birçok DNA tanı metodu arasında gittikçe artan bir öneme sahip olduğu söylenebilir. Polimeraz zincir reaksiyonu ile DNA veya cDNA da bulunan spesifik sekansların; oligonukleotidler ve ısıya dayanıklı DNA polimeraz enzimi yardımıyla milyonlarca kopyası elde edilebilmektedir. Eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonunda, PCR ürünü her döngüde sayısal olarak ölçülebilmektedir. Elde edilen DNA miktarı, oluşan her PCR ürünü ile doğru orantılı olarak artan floresan sinyallerle ölçülmektedir. Her bir döngüde floresan sinyal miktarı kaydedilir ve logaritmik faz boyunca PCR reaksiyonu görüntülenir. Floresan sinyalinin önemli ilk artışı, başlangıçtaki hedef DNA ile ilişkilidir [67].

Amplifikasyon sonrasında elde edilen ürünün varlığı farklı şekillerde belirlenebilmektedir. Bunlardan bir tanesi DNA'ya özgül olmayan bir şekilde bağlanan SYBR green boyasıdır. Primerlerin bağlanmasının ardından, uzama aşamasında hedef DNA çift sarmallı hale gelir ve DNA'ya bağlanan SYBR Green miktarı artar ve bunun sonucu olarak floresan miktarında artış gözlenir. SYBR green boyası yalnızca çift sarmal yapıdaki DNA'ya bağlandığında floresan veren bir boya olup, spesifik bir boya değildir. Bu nedenle, reaksiyon ortamında bulunan ve primerlerin birbirine spesifik olmayan bağlanmalarından kaynaklanan bir çift sarmallı DNA olduğunda da floresan yayar. Elde edilen

floresan ışımanın istenen hedef bölgenin çoğalması sonucunda oluşup oluşmadığını anlamak için erime eğrisi (Tm) analizi yapılır.

Real-Time PCR GDO analizleri için rutin olarak kullanılmaktadır. Real-Time PCR'a dayalı GDO analizleri tanımlama ve GD miktar tayinini hedefler. Tanımlama genellikle kalitatif GDO analizleri ile gerçekleştirilir ve miktar analizi katitatif GDO analizleri ile yapılır. Kalitatif analizler organizmadaki genetik modifikasyonun tespit edilebilir varlığı veya yokluğunu açığa çıkarmayı hedefler. Bu amaçla tarama metodu, gen spesifik metot, yapıya spesifik metotlar sıklıkla tercih edilmektedir. GDO'larda miktar analizleri için çeşide-spesifik metot önerilir. Günümüzde yasal düzenlemeler nedeni ile kantitatif analizler oldukça önemli bir statüye gelmiştir. Bu tarz yasal uygulamaları olan çoğu ülke kendi ihtiyaçlarına ve kaygılarına göre GDO'lar hakkında farklı yorumlamalar yapmaktadır. Ürünün ticaretinin yapılabilmesi için GD eşik değeri oldukça önemlidir ve miktar analizi tayini burada en önemli gereklilik olarak karşımıza çıkmaktadır.

2.8.3. RT-PCR'a Dayalı GDO Analizleri

Real-Time PCR'a dayalı GDO analizleri düşük hedef spesifikliğinden yüksek hedef spesifikliğe göre 4 gruba ayrılabilir. Bunları düşükten yükseğe sıralayacak olursak[68]:

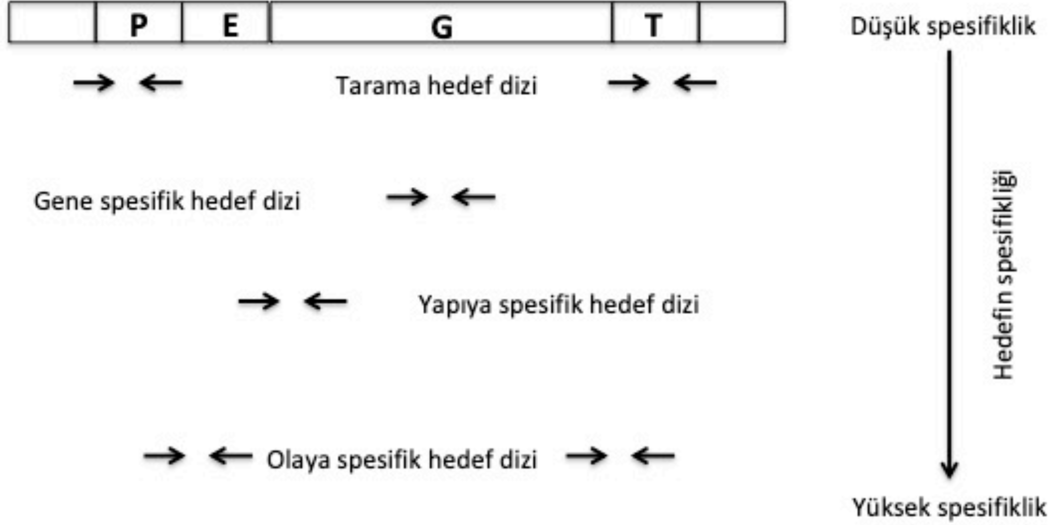
-Tarama yöntemi

-Gen spesifik metot

-Yapıya spesifik metot ve

-Çeşide spesifik metottur.

GDO analizlerinin spesifikliğinin gösterimi Şekil 2.12' de verilmiştir[68].



Şekil 2.12. Tipik bir gen yapısının ve Real-Time PCR'a dayalı GDO analizlerinden düşük spesifiklikten yüksek spesifikliğe doğru analizlerin şematik gösterimi(H= Konak genomik DNA'sı, P= Promotör, E=Arttırıcı, G= İlgilenilen gen, T= Terminatör)

2.8.3.1. RT-PCR'a Dayalı Tarama Yöntemi

Transforme edilen gen kasetlerinin büyük kısmı promotör elementi olarak karnabahar mozaik virüsünün 35S promotörünü ve terminatör element olarak ta *A.tumefaciens* nopalin sentaz terminatörünü kullanmaktadır. Bu nedenle şüphelenilen gıdalarda GDO tespitinin ilk aşamasını ortak kullanılan bu elementlerin aranmasına dayanan tarama yöntemi oluşturmaktadır. Hedef promotör ve terminatör dizilerini tanıyan spesifik olarak geliştirilmiş ileri ve geri primerler Real-Time PCR yardımı ile hedeflenen diziyi çoğaltırlar. Burada kullanılan primerlerin arasında ki mesafe fazla olmayıp 50-200 baz çifti uzaklığına kadar sağlıklı sonuçlar üretilebilir. Yapılan Real-Time PCR analizi sonucu hedeflenen promotör ve terminatör dizilerinin varlığı tespit edilir. Bu yöntem ile ilk olarak sıklıkla kullanılan promotör terminatörler analize alınırken analiz sonucu negatif çıkan analizler için daha nadir kullanılan promotör ve terminatör bileşenlerine de geçilir. Analiz sonunda sonuçların negatif yada pozitif olması durumuna göre bu veriler kaydedilir ve pozitif çıkan analizler daha ileriki GDO saptama testlerine tabi tutulur. Yine de bu ortak bulunan promotör ve terminatör dizilerinin varlığı sonucu analiz edilen örnek kesinlikle GDO'dan türetilmiş bir ürün diyemeyiz. Bunun nedeni bu promotörlerin sentetik olarak yapılmamasından kaynaklı bitki virüslerinde bulunduğundan ortamda

kontaminasyon sonucu bir geçişi söz konusu olabilir. Bu nedenle pozitif çıkan örnekler tam olarak emin olunması adına promotör, terminatör ve ilgilenilen genin bir kombinasyonu şeklinde de aranmalıdır. Öte yandan bu tarama sonucunda negatif sonucun bulunması örnekte genetik modifikasyon olmadığını da göstermez. Çünkü genetik modifikasyon transformasyona ek olarak nokta mutasyon, hedef organizmanın herhangi bir geninin çoğaltılması, delesyon, yer değiştirme gibi yöntemlerde modifikasyon teknikleri olarak kullanılabilir. Bu teknikler tarama yöntemlerinde kolay bir şekilde tespit edilemez.

2.8.3.2. RT-PCR'a Dayalı Gen Spesifik Metot

Bu yöntem ilgilenilen genin dizisini hedeflemektedir. Tarama yöntemine göre rekombinant DNA teknolojisi ile üretilen GD materyalin doğrudan hedeflenmesi nedeni ile daha spesifik bir yöntem olduğu söylenebilir. Yöntemdeki zorluk bir çok GD özellikte ticari olarak ürünün olması dolayısı ile hedeflenen dizinin çeşitliliği ve her geçen gün bunların yaygınlaşmasından kaynaklanan kompleks ortamdır. Aynı zamanda bu metot ile kapsamlı bilgiye sahip olunmayan ve izinsiz GDO'ların tespiti yapılabilinmektedir. Tür tayini de gen spesifik metot ile yapılabilir.

2.8.3.3. RT- PCR'a Dayalı Yapıya Spesifik Metot

Bu yöntem gene spesifik metottan ilgilenilen gen ve komşu diziyi içeren bir yapıyı taradığından daha spesifiktir. Başka bir deyiş ile taranan dizi; promotör ve ilgilenilen gen bölgesini yada terminatör ve ilgilenilen gen bölgesini içermektedir. Gen kaseti bu yöntem ile tanımlanabilir. Bu yöntemin kullanılabilmesi için en başta yine hangi promotör ve terminatör dizilerine ihtiyacımızın olduğunu belirlemek adına tarama yöntemi gerçekleştirilmelidir. Daha sonra bulunulan promotör ve terminatör bileşenleri ISAAA websitesinden onaylanmış GDO'lar için kullanılan veritabanından uygun yapılar elemine edilerek analize devam edilebilir.

2.8.3.4. RT-PCR'a Dayalı Çeşide Spesifik (Event-specific) Metot

Bu yöntem alıcı genomunun dizisinin bir kısmı ve dahil edilecek DNA dizisinin bir kısmını taradığından bu 4 yöntem içinde en spesifik olanıdır. Gen kasetleri A.tumefaciens, gen bombardımanı, elektroporasyon gibi yöntemler aracılığı ile gDNA'ya transfer edilir. Yönteme bağlı olarak farklı kopya sayılarında, farklı yerlere hedef DNA yerleştirilir. Herhangi bir GD ürünün onay ve izin alarak

ticarileşmesi aşamalarında; insersiyonu yapılacak DNA'nın yerleşkesi, genetik bileşenleri ve bunların kökeni, gen kaseti, genetik modifikasyon tekniği gibi bilgiler detaylı olarak halka duyurulmalıdır. Bu aşamalardan geçen ve ticarileşen bir GD ürünü bir GD çeşidi olarak adlandırılır ve aynı şekilde bir kod verilir. GD çeşitlerinin her biri eşsiz yapılardır ve insersiyonu yapılan DNA'nın kopya sayısı, yerleşkesi gibi bilgilerin tümü çeşit dahilinde kesinlikle aynıdır. Bu bilgilere ek olarak farklı çeşitler aynı gen kasetlerini içerebilmektedir fakat yukarıda sayılan modifikasyon özelliklerinden biri bile farklı olsa farklı çeşit adları ile anılırlar. Bu gibi durumlarda çeşide-spesifik yöntem ile PCR yapıldığında hangi çeşit aranıyosa o bulunur çünkü diğer yöntemler gibi bileşenlere yada yapıya bağlı bir tespit yapılmayıp konak organizma ve promotör/terminatör sekanslarının kesiştiği noktadan DNA dizisi tarandığı için 2 çeşit için pozitiflik durumu gözlenemez. Tüm bu nedenler ile çeşide-spesifik PCR en spesifik analiz yöntemi olarak karşımıza çıkmaktadır.

2.8.4. GDO Analizi için RT-PCR (Q-PCR) Metotları

Q-PCR teknikleri GDO analizleri için rutin olarak kullanılmaktadır. Q-PCR yöntemlerini genel hatları ile:

-Çift iplikçiğe bağlanan, spesifik yada spesifik olmayan amplifikasyonu ölçebilmemize olanak veren

-Florofor işaretli oligonükleotidlerin kullanıldığı ve spesifik ışımayı algılamamızı sağlayan yöntem olarak 2'ye ayırabiliriz [69].

2.8.4.1. DNA'ya Bağlanan Boyalar ve Florofor İşaretli Oligonükleotid Teknikleri

Etidyum Bromid (EtBr), SYBR Green I, YO-PRO-1, SYBR Gold, SYTO, BOXTO, BEBO, Eva Green gibi DNA'ya bağlanıp floresan ışımasını sağlayan birçok ticari boya vardır [70]. Bu küçük oyuklardan DNA'nın çift iplikli olduğu aşamada bağlanan boyalara interkalatlayıcı boyalar adı verilmektedir. Hedef DNA amplifiye oldukça ve çift iplikçikli yapı sağlandığı durumda floresan ışımasında ki artış ile DNA amplifikasyonu eş zamanlı bir biçimde izlenebilmektedir. Floresan ışıması çift iplikçik olduğu esnada gerçekleşeceğinden dolayı bu aşama PCR döngüsündeki uzama aşamasına karşılık gelmektedir. Uzama aşamasını kısaca hatırlatmak gerekirse, DNA polimeraz enziminin uygun dNTP'ler ile tamamlayıcı diziyi oluşturduğu aşama olarak tanımlayabiliriz.

Tablo 2.9. Roche Lightcycler 96 cihazının desteklediği boyalar ile farklı dalga boylarındaki emisyon ve eksitasyon dalga boylarının gösterimi [71]

PCR (firma destekleyen boyalar)	Florofor	Çıkış dalga boyu	Emisyon dalga boyu	Saptama formatı
Roche Lightcycler96	SYBR Green I	470	514	İnterkalatlayıcı boya
	ResoLight			Yüksek çözünürlüklü erime yöntemi
	FAM			Hidroliz probu
	VIC	533	572	
	HEX			Evrensel prob
	Yellow 5555			Kütüphane probu
	Red610	577	620	Hidroliz probu
	Texas Red			
	Cy5	645	697,5	

Tablo 2.10. Sigma-Aldrich, Florasan DNA probları, eksitasyon ve emisyon aralıkları ve uygun sönümleyicilerin(quencher) gösterimi[72]

PCR (firma destekleyen boyalar)	Florofor	Çıkış dalga boyu	Emisyon dalga boyu	Uygun Sönümleyici
Sigma-Aldrich	FAM	494	515	BHQ-1, TAMRA
	JOE	520	548	
	TET	521	536	
	Cal Fluor Gold 540	522	541	BHQ-1
	HEX	535	555	BHQ-1, TAMRA
	Cal Fluor Orange 560	522	541	BHQ-1
	TAMRA	555	576	BHQ-2
	Cyanine 3	550	570	
	Quasar 570	548	566	
	Cal Fluor Red 590	565	588	
	ROX	573	602	
	Texas Red	583	603	
	Cyanine 5	651	674	BHQ-3
	Quasar 670	647	667	
	Cyanine 5.5	675	694	

DNA'ya bağlanan boyaların spesifikliği spesifik diziler, spesifik olmayan diziler, primer dimerleri gibi ürünlere bağlanması nedeni ile oldukça düşüktür. Bu nedenle erime eğrisi analizi sıklıkla tavsiye edilmektedir. Erime eğrisi analizinin prensibi çift iplikçikli katı formdaki DNA'nın sıvı forma geçişi için gerekli olan

erime noktasına dayanmaktadır. Başka bir deyiş ile termal denatürasyonun orta noktasına erime noktası adı verilmektedir [70].

Erime eğrisi analizi ile artan sıcaklıkla birlikte hidrojen bağları yıkımından dolayı interkalatlayıcı boyaların DNA'ya bağlanma istekleri azalmaktadır. Erime noktası her DNA çift iplikli yapısı için kompozisyonundan ve uzunluğudan dolayı farklı ve özgündür. Bu nedenle erime noktası bilinen DNA parçaları için PCR esnasında interkalatlayıcı boyaların kullanımı sıkıntı yaratmamaktadır. Erime eğrisi analizi PCR döngülerinin bitmesinden sonra yapılan bir proses olup DNA'nın uzama sıcaklığına yakın olan 65°C civarından başlatılıp 90°C'ye aniden sıcaklık artışı ile hidrojen bağlarının kırılması, dolayısıyla floresan ışımasındaki düşüşün verdiği ters pik ile her amplikonda spesifik olan erime noktalarına göre çoğaltılan amplikonun spesifikliği hakkında fikir edinmemizi sağlar.

İnterkalatlayıcı boyalardan en sık kullanılan ticari boya SYBR Green I'dir. SYBR Green I'ın çift iplikli DNA'ya yüksek bağlanma isteği sunan 2 pozitif yükü vardır. Maksimum eksitasyon dalga boyu 497 nm ve maksimum emisyon dalgaboyu 520 nm'dir.

2.8.4.2. Florofor İşaretli Oligonükleotid Teknikler

Q-PCR metodunda kullanılan floroforlar oligonükleotidlere bağlanan küçük moleküllerdir. Floresan oligonükleotidleri davranış durumlarına göre 3'e ayrılırlar[69]:

1) primer prob
2) prob
3) nükleik asit anoloğu

Problara bağlanan haberci(reporter,verici) ve söndürücü(quencher, alıcı) olmak üzere iki florofor vardır. Q-PCR ışık kaynağından çıkan ışığın enerjisini reporter absorbe eder ve temel halden uyarılmış hale geçer. Uyarılmış duruma geçtiği zaman reporter boya, quencher boyanın absorbe edebildiği düşük dalgaboyunda ışık yayar. Reporter boya ile quencher boya arasındaki uzaklık arttığı zaman quencher'ın absorbsiyonu da düşmektedir.

TaqMan en çok kullanılan florofor işaretli oligonükleotid sistemidir. Reporter boya probun 5' ucundan ve quencher boya 3' ucundan bağlanır. Reporter ve quencher arasındaki yakın mesafeden dolayı uyarılmış olan reporter boyadan salınan ışığı quencher absorbe eder. Tavlama esnasında ışık absorbe

olduğundan ışıma meydana gelmezken, uzama esnasında Taq polimeraz ile probun degrade olması ile floresan ışımasında reporterın baskılanamamasından ortaya çıkan ışıma görülür.

2.8.4.3. TaqMan ve SYBR Green I Tekniğinin Karşılaştırılması

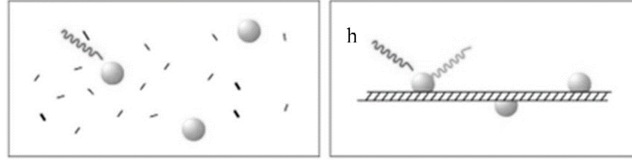
Q-PCR'da kullanılan en yaygın 2 yöntem SYBR Green I ve TaqMan metotudur. Bu 2 yöntemin etki şekli, yapıları, spesifiklikleri, hazırlanma aşamaları ve maliyetleri birbirinden farklıdır. Bunları bir tablo ile özetlersek:

Tablo 2.11. TaqMan ve SYBR Green I tekniğinin karşılaştırılması

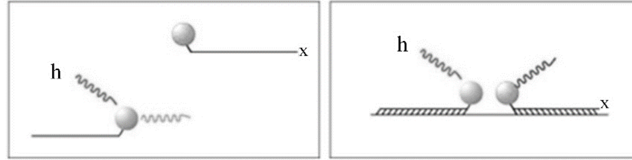
	TaqMan	**SYBR Green I**
Yapı	5'R----Q3'	İnterkalatlayıcı boya
Etki Şekli	Reporter nükleotidin 5' ucuna bağlanırken quencher boya 3' ucuna bağlanır. Aralarındaki yakın mesafeden dolayı uyarılmış reporterdan yayılan ışık quencher tarafından absorbe edildiğinden ışıma olmazken PCR'ın uzama basamağında Taq Polimerazın 5'endonükleaz aktivitesi ile birlikte probun hidrolize olması ile reporter boyadan floresan ışıma yayılır.	Boya çift iplikli DNA'nın küçük oyuklarına bağlanarak uzama esnasında floresan ışıma yayar.
Hazırlanışı	Primer prob dizaynları gereklidir.	Primer dizaynı gereklidir.
Spesifikliği	Hedef diziye spesifiktir.	Hedef diziye spesifik değildir ve bu nedenle spesifikliğin değerlendirilmesi adına erime eğrisi analizi gereklidir.
Esneklik	TaqMan probları hedef dizilere spesifik olduğundan farklı primer setleri ile başka Q-PCR analizinde kullanılamazlar.	SYBR Green I hedef diziye spesifik olmadığı için farklı Q-PCR uygulamalarında farklı primer setleri ile kullanımı mümkündür.
Maliyet	Pahalı	Ucuz
Gerekli Zaman	Termal profil; denatürasyon, tavlama ve uzama aşamalarından oluştuğundan hızlıdır.	Termal profil denatürasyon, tavlama ve uzama aşaması sonrası erime eğrisi analizinden oluştuğundan yavaştır.

SYBR Green ve TaqMan Probları kullanılarak gerçekleştirilen Real time PCR'ın yanı sıra hibridizasyon probları kullanılarak gerçekleştirilen Real Time PCR tekniği ilkeleri verilmiştir. Hibridizasyon probları kullanılan teknik olarak amplifiye fragmentler eş zamanlı olarak sekansa spesifik hibridizasyon problarının oluşturduğu floresanla tespit etmektedir. Her bir amplikon için problardan bir tanesi 5' ucundan 640 veya 705 nm'de ışıma veren florofor ile işaretlenmiştir ve amplifikasyon esnasında zincir uzamasını engellemek için 3' ucu fosforlanmıştır. Diğer prob ise Flourescein ile 3' ucundan işaretlenmiştir. Her PCR döngüsünün primerlerin bağlanma fazı esnasında, bu problar amplikonun bir internal sekansını hibridize etmektedirler. Sadece hibridizasyon esnasında birbirlerine çok yakın olan bu iki fluorophore arasında floresan enerji transferi (FRET) oluşur. FRET esnasında donör molekül olan Florescein RT-PCR cihazının ışık kaynağı vasıtası ile ışıma yapar ve açığa çıkmış olan bu enerji akseptör molekül olan Red'e transfer edilir. Dışarı verilen floresan ışıma cihaz tarafından okunur. SYBR Green, hibridizasyon ve TaqMan problarının çalışma prensibinin görselleştirilmiş hali Şekil 2.13'de verilmiştir [59].

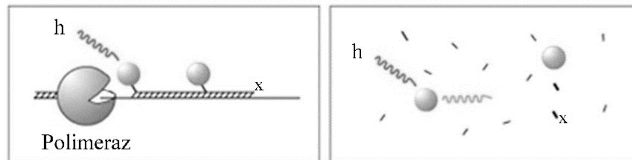
I. SYBR Green



II. Hibridizasyon Probları



III. TaqMan Probları



Şekil 2.13. SYBR Green, hibridizasyon ve TaqMan problarının çalışma prensibi

2.9. Proteine Dayalı GDO Saptama Yöntemleri ile DNA'ya Dayalı GDO Saptama Yöntemlerinin Karşılaştırılması

Analitik yöntemler hem protein hemde DNA'ya dayalı metotlar ile gerçekleştirilebilir. İşlenmiş ürünler için proteinin degredasyonu nedeni tam olarak saptama yapılamayacaksa da bu gibi durumlarda da DNA daha güvenilir bir moleküldür ve DNA hedeflenmesi daha kesin sonuçlar verecektir. Bunun nedeni ilk olarak işlenmiş ürünlerde farklı mekanik prosesler sonucu proteinlerin termodinamik olarak kararsız olması ve daha kırılgan bir yapıya sahip olduğundan yapının bozulmasıdır. Proteinlere oranla DNA'nın daha dayanıklı bir yapı olarak karşımıza çıkar. İkinci olarak bitkilerdeki genetik modifikasyon bitkinin tüm bölgelerini etkileyemeyebileceğinden bitkinin bazı bölümlerinde bu transgenik gen transkripsiyonu olmayabilir. Bu gibi olası durumlarda proteine dayalı yöntemler ile saptama yapıldığında yanlış negatiflik durumları söz konusu olabilir. Transgenik genin ifade düzeyi bitkinin herhangi bir bölümü, doku tipi, mevsim, günün belli zamanları, bitkinin yaşı, nem, sıcaklık, stres koşulları, ekili olduğu bölgenin lokasyonu gibi parametreler ile değişebilmektedir. Bu gibi sonuçlar homojen bir hedef protein dağılımı oluşturmadığından saflaştırılan protein farklı oranlarda hesaplanabilir ve bu nedenle DNA'nın miktarı ve kompozisyonu bitkinin herhangi bir bölümü, doku tipi , mevsim, günün belli zamanları, bitki yaşı, nem, sıcaklık, stres koşulları ve ekili olduğu alanın yerleşkesi gibi durumlarda değişmediğinden çok daha kesin ve güvenilir sonuçlar verir.

2.10. GDO Saptanmasında Sertifikalı Referans Materyaller (CRM)

CRM'ler daha güvenli gıda ve yem, daha iyi sağlık hizmeti, çevreyi hedeflenen materyalin nitelik ve içeriği bakımından korunmasının sağlanabilmesi için temel kaynaklardır. Aynı zamanda CRM'ler GDO'lar için uluslararası düzeyde izlenebilirliği, daha güvenilir ve kesin GDO analizlerini yapılabilmesi için de üretilmişlerdir [73]. CRM'lerin varlığına dayanarak bir çok ülke geçtiğimiz yıllarda kendi izlenebilirliği ve etiketleme yasal düzenlemelerini kendi ihtiyaçlarına göre ayarlamışlardır. CRM'ler Q-PCR ile GDO saptanması için en güçlü ve kesin analitik araçlardır. Avrupa Birliği için izin alınacak bir GDO durumu söz konusu ise CRM'ler ön koşulu oluşturmaktadır. CRM'lerin üretimi, sertifikasyonu ve kullanımı ilgili ISO Uluslararası Standardizasyon Örgütü(ISO) ve Referans topluluk bürosu (Community Bureau of Reference, BCR)

rehberlerine uyumlu olarak gerçekleştirilir [74]. Aynı şekilde üretimleri ve sertifikalandırma işlemleri Avrupa Komitesi Ortak Araştırma Merkezi- Referans Materyal ve Ölçümleri Enstitüsü(EC-JRC-IRMM) tarafından yapılır.

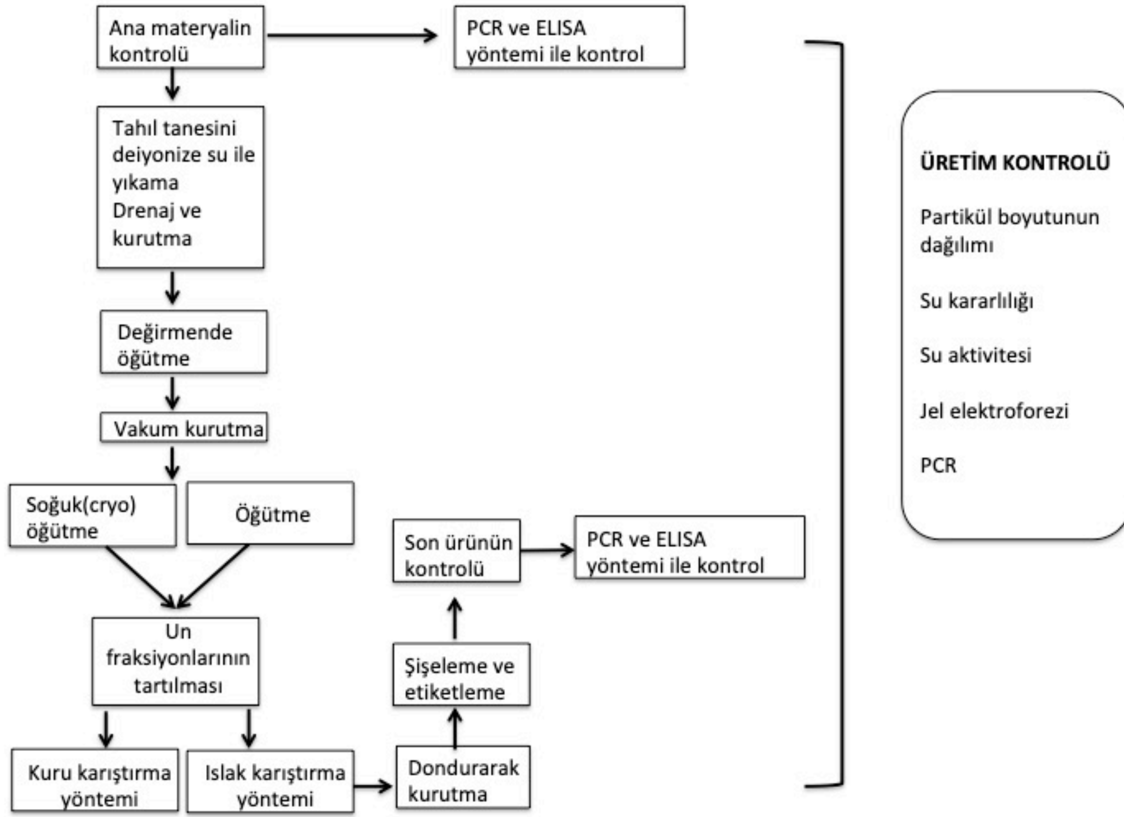
CRM'ler ERM-BF ve ERM-AD kodlu olmak üzere iki farklı gruba ayrılırlar.BF kodu, kalibrasyon veya kalite kontrolü için kullanılırken AD kodu GDO'ların nicel ölçümü için kalibre edilmesinde kullanılır [75]. CRM'ler her bir GD çeşidi için eşsiz olarak bitkinin uygun parçasından(tohumu yada meyvesinden) üretilir. CRM'ler GD ve GD olmayan bitki parçalarının gravimetrik olarak karıştırılması sonucu 0g/kg ve 1000g/kg aralığında değişen matriks materyaller olarak da bilinirler.

CRM'ler genellikle gravimetrik olarak GD ve GD olmayan bitki parçalarının karıştırılması sonucu kuru toz formunda elde edilir ve bu aşamaları:

1) Temel malzemesinin karakterizasyonu
2) Tane yüzeyinin temizlenmesi(dekontaminasyonu)
3) Tanelerin öğütülmesi
4) Farklı ağırlık miktarlarında karıştırılması
5) Argon atmosfer altında şişelenmesi
6) Etiketleme aşaması
7) Son ürünün kontrolü olarak sıralayabiliriz.

Kuru toz formu ortalama 35µm olan uygun partikül çapına inmesi için cryo-öğütme kullanılır [74]. Partikül çapının uygun boyuta indirilmesi; ölçüm sisteminin yanılmaması için gerekli olan parti boyunca homojenliğini ve partikülün olabildiğince stabil olmasını sağlamaktadır. Homojenizasyonu sağlarken DNA degredasyonları da görülebilmektedir fakat saydığımız nedenlerden dolayı yararları ile kıyaslanınca bu olası durum pek sorun teşkil etmemektedir. Genellikle CRM'lerin ölçüm biriminin kütle fraksiyonuna dayalı olduğu düşünülür [73]. Avrupa Komitesine göre ölçüm biriminin "Bir haploid genomda GD DNA kopya sayısının hedef takson-spesifik DNA kopya sayısına oranı" olarak kullanımı önerilmektedir. Sonuç olarak ölçüm birimi her iki şekilde de ifade edilebilip tarafların bu kavramı belirtmeleri özgür bırakılmıştır.

GDO CRM'lerin kuru ve ıslak karışım ile üretim aşamasında ve üretim kontrolünde önemli basamaklar Şekil 2.14' de gösterildiği gibidir.



Şekil 2.14. GDO CRM'lerin kuru ve ıslak karışım ile üretim aşamasında ve üretim kontrolünde önemli basamaklar [74]

2.11. GDO Referans Sistemi

GDO referans sistemi analizlerin zaman ve lokasyondan bağımsız olarak güvenilir ve kıyaslanabilir GD ölçüm sonuçlarının başarılması için kullanılır [73]. Bu sistem 3 komponenti olan sürdürülebilir ve bilimsel bir metoda dayanıp bunlar:

1) Valide bir nicel analiz metodu
2) Kalibrant ile Q-PCR
3) Matriks ile eşleşen materyaldir.

Bu kapsamda sertifikalı referans materyaller bu sistemi karşılayan en önemli bileşenlerdir. GDO referans sistemi yukarıda anlatılan kütle fraksiyonu yada kopya numarasına dayalı ölçüm sistemleri ile gerçekleştirilebilir. Gravimetrik yöntem ile kütle esasına dayalı GD ve GD olmayan unların karıştırılmasında kullanılan ölçüm birimi g/kg'dır [73]. Kopya sayısına bağlı yöntemde ise direk olarak GD materyalin kopya sayısının referans olan takson-spesifik DNA'ya

oranlanmasından dolayı birimsizdir.

2.12. Nicel Analiz Tipleri

Q-PCR yöntemi ile ilgili nicel analizler relatif nicel analiz ve mutlak(absolute) analiz olmak üzere 2 sınıfa ayrılır. GDO analizleri kütle fraksiyonu yada GD kopya sayısına dayandığından relatif nicel analiz kullanılabilir. Aslında relatif nicel analiz GD genin GD olmayan gene mutlak analizlerinin bir oranıdır. Relatif nicel analiz 2 yöntem ile yapılabilmekte olup bunlar:

1) Delta CT metodu

2) 2 mutlak analizin kullanılmasına dayanan metot

Bunlardan Delta CT metodu ile yüzde GD oranı:

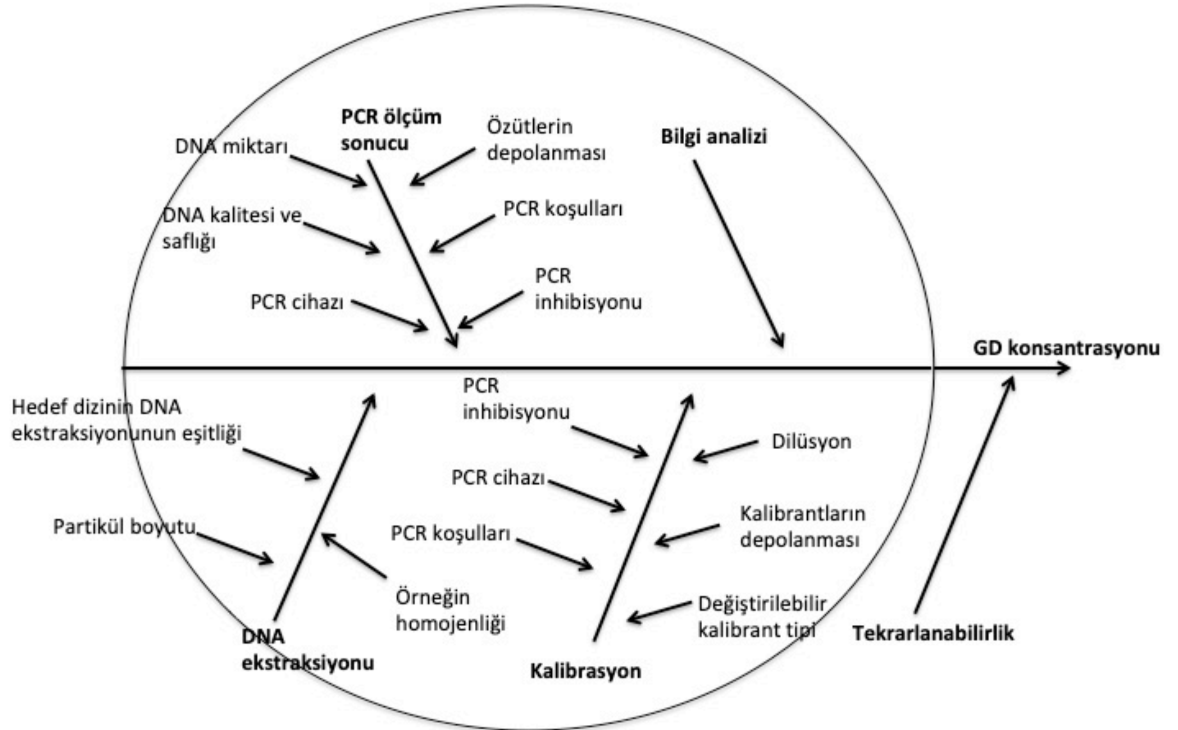
GD%= (1/2exp(Δct))x100%) formülü ile hesaplanabilir. Bu eşitlik 2 hedef için amplifikasyon veriminin aynı olduğu durumlarda kullanılabilir. İkinci yöntem 2 tane mutlak analize dayanmaktadır. 2 farklı standart eğri GD çeşidi ve takson-spesifik gen için oluşturulur. Yüzde oranları da 2 farklı standart eğri sonucunda hesaplanabilir [76].

2.13. Güvenilir GDO Analizleri için İstatistiki Terimlerdeki Gereklilikler

2.13.1. Ölçüm Belirsizliği

ISO tanımına göre ölçüm belirsizliği, ölçülen miktar hakkında atfedilen değerlerin dağılımını karakterize eden negatif olmayan bir parametredir. Analitik olarak ölçülen tüm sonuçlar kendi ölçüm belirsizliği değerine sahiptir. Ölçüm belirsizliğinin belirlenmesi aşamasında analitik metot ile ilgili olası tüm belirsizlik kaynakları hesaba katılmalıdır.

Ölçüm belirsizliği için geçerli olan bottom-up yani aşağıdan-yukarıya yaklaşım balık kılçığı adı verilen diyagram ile görselleştirebiliriz (Şekil 2.15)[77]:



Şekil 2.15. Neden-sonuç diyagramı(balık kılçığı), Real-Time PCR ile GDO miktar analizinde olası ölçüm belirsizliğine katkıları

Bu şekilden de görüleceği gibi aşağıdan yukarıya doğru bakıldığında karşımıza ilk olarak DNA ekstraksiyonu çıkmaktadır. DNA ekstraksiyonunda ise partikül boyutu, örneğin homojenliği, hedeflenen diziler için eşit DNA ekstraksiyonu gibi işlemler ölçüm belirsizliğine katkıda bulunabilir. Bu aşamadan sonra PCR ölçüm sonuçlarında ilk olarak DNA miktarı, ekstrakte edilmiş DNA'ların depolanması, DNA kalitesi ve saflığı, PCR koşulları, PCR cihazı ve PCR inhibisyonu olası ölçüm belirsizliğine katkıda bulunan aşamalardır. Bu aşamadan sonra kalibrasyonda; kalibrant tipinin değiştirilebilirliği, PCR koşulları, kalibrantın depolanması, PCR cihazı, dilüsyonlar, PCR inhibisyonu aşamaları sırası ile ölçüm belirsizliğine katkı sağlayabilir ve son olarak da veri analizlerinden kaynaklı ölçüm belirsizliği görülmektedir. Bunlara ek olarak ölçüm sonuçlarındaki ölçüm belirsizliği kişisel ölçümlere de dayandırılmalıdır ve her laboratuvar tanımlı koşullar altındaki spesifik ölçüm belirsizliğini hesaplamak durumundadır [77]. Ancak ölçüm belirsizliği hesabından sonra analizlerin sonucu anlamlı hale gelmektedir.

Ölçüm belirsizliğinin tahmini tüm ölçüm performansı için kesinlik, doğruluk, netlik, hata, tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik hakkında bilgi verir.

2.13.2. Ölçüm Performansı

Ölçüm performansı nicel ve nitel karakterine göre 2 gruba ayrılabilir. Doğruluk, kesinlik ve keskinlik nitel performans karakterleri olarak nitelendirilir. ISO 3534-1 (2006)'ya göre kesinlik test sonucu ile kabul edilen referans değer arasında anlaşılan yakınlıktır ve doğruluk bir seri test sonucundan elde edilen ortalama değer ile kabul edilen referans değer arasındaki yakınlıktır, keskinlik konulmuş bazı şartlar dahilinde yürütülen bağımsız test sonuçları arasındaki yakınlıktır. Birbirleri ile yakından bağlı olan bu terimler nitel anlatımlar için kullanılır [78].

Toplayacak olursak bu terimler analiz sonuçları arasındaki farklılıklara dikkat çekmekte olup bu değişiklikler de farklı tipteki hatalardan kaynaklanmaktadır [79]. Hata tipleri performans özellikleri arasındaki ilişki Şekil 2.16'da gösterilmiştir[77].

Şekil 2.16. Hata tipleri ve performans özellikleri arasındaki ilişki gösterimi

Tekrarlanabilirliğin, yeniden üretilebilirliğin ve laboratuvar içinde tekrar üretilebilirliğin hatası ve standart sapması miktar analizi performansı özellikleri olarak düşünülebilir. Bu kavramlar ölçüm belirsizliği ile yakından ilgilidir. ISO 3534-1' e göre hata, test sonuçları ve kabul edilmiş referans değer arasındaki farkın bir göstergesidir. Tekrarlanabilirlik koşulları altında tahmin keskinliği olarak açıklanır ve tekrar üretilebilirlik de, tekrar üretilebilirlik koşulları altında tahmin keskinliği olarak tanımlanır.

Tekrarlanabilirliğin standart sapması(RSD_r) tekrarlanabilirlik koşullarında elde edilen test sonuçlarının standart sapması olarak tanımlanır. Tekrarlanabilirlik koşulları, aynı test metodunun aynı test araçları ile aynı laboratuvarda aynı operatör ve ekipman ile kısa zaman aralıkları dahilinde yapılması durumunu açıklamaktadır [77].

2.13.3. Güvenilir GDO Analizleri için Kullanılan Diğer İstatistiki Terimler

2.13.3.1. Z-skoru

Paralel çalışmalardaki gözlemler veya raporlanan sonuçlar toplandıktan sonra sonuçların ortalaması ve standart sapmaların ortalaması istatistiki analiz için hesaplanır. Güvenilir sonuçlar üretebilmek adına ortalama ve standart sapma arasındaki ilişkiyi gösteren z skoru hesaplanmalıdır. Farklı laboratuvarların ve farklı örnek konsantrasyonlarının sonuçlarının karşılaştırılması adına bu hesaplama önemlidir.

Z skorunun=0 olduğu durumlarda sonuç mükemmeldir. Fakat bu değeri en önde gelen laboratuvarların bile nadiren başardığını gözden kaçırmamak gerekir. Z skoru ortalamadan yüksek yada düşük değere sahip olabilir. İşaret sonucun pozitif mi yada negatif mi olduğunu gösterir. Z skorunun %95'inin -2 ile +2 arasında olması sonuçların kabul edilebilir ve tatmin edici olduğunun bir göstergesidir. Eğer z skoru -3 ile +3 arasında bir değer ise sonuç kabul edilemez ve veriler tatmin edici değildir. Son olarak sonuçlar -3 ile -2 ve 3 ile 2 arasında ise sonuçların şüpheli olduğu söylenebilir.

Lineer regresyon ile elde edilen standart eğrinin korelasyon katsayısının değeri R^2 katsayısı olarak adlandırılır. Diğer bir deyiş ile R^2 istatistiki modele bilginin ne denli uyduğunun bir göstergesidir. Korelasyon katsayısının karesi alınarak hesaplanır. GDO analizlerinde, korelasyon katsayısı ölçülen Ct değerinin ve konsantrasyon/kopya sayısının lineer regresyonu olarak tanımlanır. R^2 katsayısının ortalama değeri ≥ 0.98 olmalıdır [80].

2.13.3.2. Saptama Sınırı (LOD) ve Ölçüm Sınırı (LOQ)

Analizin saptama sınırı (LOD) örnekte saptanacak olan analitin saptanabilinen en düşük miktarı veya konsantrasyonudur [77]. Saptama sınırı hedef konsantrasyonun 1/20 sinden az olmalıdır [80].

Analizin miktar olarak ölçülebilmesinin sınırı (LOQ) kabul edilebilir keskinlik ve doğrulukta örnek içinde miktar olarak saptanacak analitin en düşük miktarı yada

konsantrasyonunu tanımlamaktadır [77]. Hedef konsantrasyon LOQ değerinden 10 kat fazla olmalıdır. RSD_r (tekrarlanabilirliğin standart sapması) değeride %25'den az olmalıdır [80].

2.13.3.3. Sağlamlık, Uygulanabilirlik, Pratiklik, Spesifiklik, Dinamik Kapasite, Amplifikasyon Verimi

Analitik analizin sağlamlığı, analiz parametrelerinde küçük ama kasıtlı olarak yapılan değişikliklerden etkilenmemesi durumunun bir ölçüsüdür. Bu normal kullanımlarda analitik analizin güvenilirliğinin bir göstergesidir.

Sağlamlık, analitik çözeltilerin stabilitesi, sıcaklık, sıcaklığa maruz kalma süresi gibi analiz parametrelerindeki kasıtlı değişiklikler ile ilgili analizin güvenilebilirliğini gösterir [81].

Uygulanabilirlik; kabul edilebilir kurtarma ve metodun uygulanabileceği analitler, matrisler, konsantrasyon ile tekrarlanabilirliği tanımlanmış metodun bir özelliğidir [82].

Pratiklik; analit maliyeti ve verim bakımından gerekli performans kriterlerine ulaşmak için analizin kolaylığını tanımlamaktadır [77].

Spesifiklik; ilgilenilen özellik ve analit için metodun özelliklerinin ne kadar iyi uyuştuğunu tanımlamaktadır.

Dinamik kapasite: kabul edilebilir doğruluk ve keskinlik seviyesinde lineer bir davranış sergileyen konsantrasyon kapasitesini tanımlamaktadır [69,72].

Amplifikasyon verimi; her döngüde %100 verim ile -3.32 teorik eğimini gösteren çoğaltma oranını tanımlamaktadır. Verimlilik= $10^{(-1/\text{eğim})}$ ve % Verimlilik = Verimlilik x 100 olarak tanımlanabilir.

Standart eğrinin eğimi -3.1 ile -3.6 arasında olmalıdır [80]. -3.1 den -3.6'ya kadar olan aralık amplifikasyon veriminin standart eğrisini kullanabilecek kadar iyi olduğunu gösterir.

2.14 Yeterlilik Testi Matrisleri

Yeterlilik test materyalleri üreticileri GD gıda ve yem analizi için kullanılacak matrisleri; işlenmiş matrisler ve işlenmemiş matrisler olarak 2 ana grupta sınıflandırırlar. GD yeterlilik testlerinde işlenmemiş matrisler unlardan oluşmakta iken işlenmiş matrisler bisküvi gibi işlem görmüş numunelerden oluşmaktadır. İşlenmiş gıda ve yem ürünleri genellikle DNA içeriği bakımından elverişli kaynaklar değillerdir. Bunun nedeni gıdaların işlenmesi süreçlerinde DNA'da

meydana gelen degredasyon sonucu baz çiftlerinin 200-1000 baz çifti (bazen daha düşük miktarda) aralıklarına kadar parçalanmasından kaynaklanmaktadır [83].

Normal durumlarda GDO etiketlenmesi işlemleri çiğ materyalin proses öncesinde GD içeriğene bakılarak ve daha sonra üretim zinciri sırasında izi sürülerek gerçekleştirilmektedir. Bunun nedeni, işlenmiş gıdalarda kantitatif PCR yöntemlerini kısıtlayan bir kaç faktör vardır. Analiz edilecek örnek proses sırasında ki DNA degredasyonu nedeni ile çoğaltılacak diziyi içeremeyebilir. Böyle bir durumda, tespit limiti (LOD-limit of detection) ve ölçüm limiti (limit of quantification) değerlerini etkileyecektir [78]. Bu durum genellikle özel primer-prob sistemlerinin 60-150 baz çifti uzunluğuna ayarlanması ile üstesinden gelinebilir [84]. Ölçülen materyal içerisine DNA ve partiküllerin homojenitesi diğer önemli faktörlerdendir. Moreano ve arkadaşlarının, aynı gıdalardaki üretim işlemleri sırasında gerçekleşen ve GDO ölçümü esnasında ne tip bozukluklarının ortaya çıktığını gösteren bir çalışmaları literatürde mevcuttur [85].

2.15. Yeterlilik Testi Tedarikçileri

Dünyada varolan önemli, GDO için yeterlilik testi sağlayıcıları aşağıda sıralanmıştır.

1) Fapas (GD Şeması) GeMMA yeterlilik testleri programı (İngiltere);

Fapas, gıda sektörüne yıl boyunca ürün sunan, kalite kontrol örnekleri, referans materyalleri, yeterlilik testi alanında lider, global tedarikçidir. 1990 yılında kurulmuş olan, gıda ve su, çevre kimyası ve mikrobiyoloji sektörleri için deneyimli, akredite bir yeterlilik testi sağlayıcısıdır. Fapas yeterlilik testleri gıda kimyası, gıda mikrobiyolojisi, genetik modifiye organizma (GD), su ve çevre analizlerini kapsar. Fapas GD soya ve mısır da dahil olmak üzere gıda örneklerinde genetik modifiye organizma içeren ürünün tespiti veya miktar tayini için yeterlilik test materyali üretmektedir. Fapas GD, yeterlilik testi için uluslararası kuralları takip eder ve UKAS tarafından ISO / IEC 17043'e göre akredite edilmiştir [86].

2) ISTA (International Seed Testing Association) yeterlilik testleri programı (İsviçre);

Tohum testi alanında standart prosedürler geliştirmek ve yayınlamak amacıyla 1924 yılında kurulmuştur. ISTA tohum örnekleme ve test için uluslararası kabul

edilmiş kuralları üretir, laboratuvarları akredite eder, araştırmalara destek verir, uluslararası tohum analizi sertifikaları ve eğitimleri düzenler.

3) BIPEA (Bureau Interprofessionnel d'Etudes Analytiques) yeterlilik testleri programı (Fransa);

40 yıldır tahıl ve öğütme, gıda ve yem, çevre ve kozmetik alanında yeterlilik testleri üreten BIPEA, Genetik Modifiye Organizmalar için yeterlilik testi programını 2000 yılında oluşturulmuştur ve 11 farklı ülkeden 21 laboratuvar bu programa kayıtlıdır. Testler her yıl 3 kere uygulanmakta olup analiz için 4 hafta süre tanınmaktadır.

4) JRC (Joint Research Center) yeterlilik testleri programı (Avrupa Birliği);

Genel amacı Laboratuvarlar arası karşılaştırmalar yolu ile katılımcı performansını önceden belirlenen kriterlere göre değerlendirmektir. Nicel, nitel, ardışık, eş zamanlı, tek GD çeşidi, sürekli program testleri ile kapsamlı bir test aralığı sunmaktadır.

5) GIPSA (The Grain Inspection, Packers and Stockyards Administration) yeterlilik testleri programı (ABD);

Amerika'da ticari hale gelen GD tahılların ve yağlı tohumların testi için bir Yeterlik Programı sunmaktadır.

Yurt dışı bağımlılığımız bulunan yeterlilik testlerinde ulusal ve akredite bir YT/LAK test materyali ile sistematiğinin geliştirilip uygulanması, daha uygun bir maliyet ile katılımcı laboratuvarların test için ödediği miktarın azaltılmasında ve bu tutarın ülke ekonomisine katkı sağlaması bakımından önemlidir.

2.16. Çalışmanın Amacı

Bu çalışmada, genetik modifiye organizmaların (GDO) tespiti için yeterlilik test kitinin geliştirilmesi, geliştirilecek olan yeterlilik test kiti kullanılarak Türkiye'de GDO analizi yapan tüm laboratuvarlar tarafından TS ISO/IEC 17043 standardına uygun bir sistematiğin kurulması ve uygulanması amaçlanmıştır.

Bu çalışma ile laboratuvarlar arası metot birliği, standart sonuçların elde edilmesi ve GDO ile taklit ve tağşişin saptanması konusunda yoğun olarak karşılaşılan problemlerin aşılması hedeflenmiştir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Sertifikalı Referans Materyaller

Sertifikalı referans malzeme(CRM) olarak Amerikan Petrol Kimyacıları Birliği(AOCS) tarafından sağlanan GD ve GD olmayan mısır ve soya unları genomik DNA temelli YT/LAK testi ölçümleri için kullanılmıştır. Bu araştırmada MON87701 Soya ve MIR604 mısır çeşidini içeren CRM kullanılmış olup bunların ticari kodları aşağıdaki gibidir:

1) GD içermeyen mısır AOCS 0407-A
2) %100 MIR604 mısır AOCS 0607-A2
3) GD içermeyen soya AOCS 0906-A
4) %100 MON87701 soya AOCS 0809-A

3.1.2. GD İçermeyen Unlar

Ticari bir şirketten sağlanan mısır ve soya unları GD içermeyen un olarak matrislerin oluşturulma sırasında kullanılmıştır.

3.1.3. Ekipmanlar

Çalışmada, DNA ekstraksiyonu ve RT-PCR aşamasında kullanılan ekipmanlar aşağıdaki gibidir.

1) Isıtıcılı Blok (Major Science MD-01N
2) Mikrosantrifüj (Neuation i Fuge BL08VT)
3) Spektrofotometre cihazı (Nanodrop 2000c)
4) Buzdolabı -20°C
5) RT-PCR cihazı (Roche Lightcycler96)
6) Vorteks (Biosan Vortex V-1 Plus)
7) Plate Santrifüj (MiuLab MINIP2500 Micro-plate Centrifuge)
8) Analizi çalıştırmak için yazılım arayüzü (Roche Lightcycler yazılım)

3.1.4. Kimyasallar

Çalışmamızda DNA ekstraksiyonu için kullanılan kimyasallar “Biotecon foodproof Sample Preperation Kit III” içeriğinde yer almaktadır:

1) foodproof Sample Preperation Kit III Ekstraksiyon tamponu

2) foodproof Sample Preperation Kit III Bağlama tamponu
3) foodproof Sample Preperation Kit III Yıkama tamponu
4) foodproof Sample Preperation Kit III Elüsyon tamponu
5) foodproof Sample Preperation Kit III Proteinaz K

RT- PCR aşamasında kullanılan kimyasallar aşağıdaki gibidir:

1) Roche LightCycler® 480 Probes Master (2x)
2) Reaksiyon başına Adh1 mastermiksi için:
- Adh1 İleri Primer (20 μM) 0,3μL
- Adh1 Geri Primer (20 μM) 0,3μL
- Adh1 Prob (20μM) 0,2μL
- ddH_2O 4,2μL
3) Reaksiyon başına MIR604 mastermiksi için:
- MIR604 İleri Primer (20μM) 0,6μL
- MIR604 Geri Primer (20μM) 0,3μL
- MIR604 Prob (20μM) 0,2μL
- ddH_2O 3,9μL
4) Reaksiyon başına Le1 mastermiksi için:
- Le1 İleri Primer (20 μM) 0,375μL
- Le1 Geri Primer (20 μM) 0,375μL
- Le1 Prob (20μM) 0,125μL
- ddH_2O 5,125μL
5) Reaksiyon başına MON87701 mastermiksi için:
- MON87701 İleri Primer (20μM) 1,5μL
- MON87701 Geri Primer (20μM) 1,5μL
- MON87701 Prob (20μM) 0,625μL
- ddH_2O 2,375μL

3.1.5. Sarf Malzemeler

1. RT-PCR'a uygun plastik reaksiyon küvetleri (strip ve plateler)
2. RT-PCR plate için kapama folyosu (sealing foil)
3. Mikropipet
4. Reaksiyon tüpleri için raf
5. 1.5 / 2 ml reaksiyon tüpleri
6. Filtreli Tüp

7. Koleksiyon Tüpü
8. Mikropipetler (0.5-10 µL, 10-100 µL, 100-1000 µL)

3.1.6. Primer ve Problar

MIR604 mısır ve MON87701 soya çeşitleri için RT-PCR ile miktar tayini amacıyla uygulanan yöntemde kullanılmış olan primer prob dizileri Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1. Seçilen primer ve prob dizileri

MIR604 primer F(ileri) (mısır çeşidine spesisifik)	5' –GCG CAC GCA ATT CAA CAG-3'
MIR604 primer R(geri) (mısır çeşidine spesisifik)	5' –GGT CAT AAC GTG ACT CCC TTA ATT CT-3'
MIR604 prob	6-FAM 5'- AGG CGG GAA ACG ACA ATC TGA TCA TG-3' BHQ-1
Zm adh1-F(ileri) primer (mısır taksonuna spesifik)	5' – CGT CGT TTC CCA TCT CTT CCT CC-3'
Zm adh1-R(geri) primer (mısır taksonuna spesifik)	5' – CCA CTC CGA GAC CCT CAG TC -3'
Zm adh1 - P prob	YAKIMA YELLOW 5' – AAT CAG GGC TCA TTT TCT CGC TCC TCA-3' TAMRA
Le1 F(ileri) (soya taksonuna spesifik)	5' – CCA GCT TCG CCG CTT CCT TC – 3'
Le1 R(geri) (soya taksonuna spesifik)	5' – GAA GGC AAG CCC ATC TGC AAG CC – 3'
Le1 P (Prob)	6-FAM 5' – CTT CAC CTT CTA TGC CCC TGA CAC – 3' BHQ-1
MON 87701 1 R(geri) (soya çeşidine spesifik)	5' – CGT TTC CCG CCT TCA GTT TAA A – 3'
MON 87701 2 F(ileri) (soya çeşidine spesifik)	5' – TGG TGA TAT GAA GAT ACA TGC TTA GCA T – 3'
MON 87701 (Prob)	6 - FAM 5' – TCA GTG TTT GAC ACA CAC ACT AAG CGT GCC – 3' BHQ-1

3.2. Metot

3.2.1. Yeterlilik Test Kiti

3.2.1.1. Yeterlilik Test Kiti Matrislerinin Türleri

Bu çalışmada, gıda ve yem ürünleri için GDO Yeterlilik Test Kiti sertifikalı referans materyale dayalı olarak hazırlanmıştır. Yeterlilik test kiti içerisinde 4 adet farklı matris ve her biri için ayrı ayrı hazırlanan kontrol grupları yer almaktadır. Matrislerin türleri ve kodları aşağıda verilmiştir:

1) Tek GD Çeşidi İşlenmemiş Matris

Bu grup içerisindeki matrisler herhangi bir işlemden geçmemiş olup sadece belirli bir bitki ve ilgili GD çeşidini içermektedir. Bu grup içerisinde hazırlanan iki farklı matris aşağıdaki gibidir:

- %1 MIR604 içeren mısır unu HU-1A

- Mısır unu kontrol grubu HU-1B
- %2 MON87701 içeren soya unu HU-2A
- Soya unu kontrol grubu HU-2B olarak adlandırılmıştır.

2) Karışık GD Çeşidi İşlenmemiş Matris

Bu grup içerisindeki matrisler herhangi bir işlemden geçirilmemiş; iki bitki referans geni ve iki hedef geni aynı oranda bir arada bulunduran un şeklinde hazırlanmıştır:

- %2 MON87701 ve %2 MIR604 içeren soya ve mısır unu karışımı HU-3A
- Mısır ve soya unlarının karışımı olan kontrol grubu HU-3B olarak adlandırılmıştır

3) Karışık GD Çeşidi İşlenmiş Matris

Bu grup içerisindeki matrisler ısıl işlemden geçmiş olup iki referans geni ve iki hedef geni aynı oranda bulunduran bisküvi şeklinde aşağıdaki gibidir:

- %2 MIR604 ve %2 MON87701 içeren soya ve mısır unu içeren bisküvi HU-4A
- Mısır ve soya unu karışımı içeren bisküvinin kontrol gurubu HU-4B olarak adlandırılmıştır.

3.2.1.2. Yeterlilik Test Kiti Matrislerinin Hazırlanması

Yeterlilik test materyali ticari olarak tedarik edilen %0 GD Mısır ve Soya unu ile AOCS'den tedarik edilen %100 konsantrasyonlarında ki MIR604 mısır ve MON87701 soya unlarının aşağıdaki tablolarda görülmek üzere ağırlık/ağırlık (w/w) esasına göre belli matrislerin elde edilmesi ile hazırlanmıştır. Sarf malzeme hesaplamaları, bu 8 farklı testin, 10 laboratuvarın test edebileceği miktarlarda hesaplanmış ve tablolarda (Tablo 3.2.- 3.4.) karışım miktarları gram üzerinden verilmiştir.

Tablo 3.2. Tek GD çeşidi işlenmemiş matris GD oranı ve miktarı

Örnek	% GD	MON 87701 Soya Miktarı %100 GD (g)	MIR604 Mısır Miktarı %100GD (g)	Mısır Unu Miktarı %0 GD (g)	Soya Unu Miktarı %0 GD (g)
HU-1A	1	0,00	0,30	29,70	0,00
HU-1B	0	0,00	0,00	30,00	0,00
HU-2A	2	0,60	0,00	0,00	29,40
HU-2B	0	0,00	0,00	0,00	30,00
Toplam		0,60	0,30	59,70	59,40

Tablo 3.3. Karışık GD çeşidi işlenmemiş matris GD oranı ve miktarı

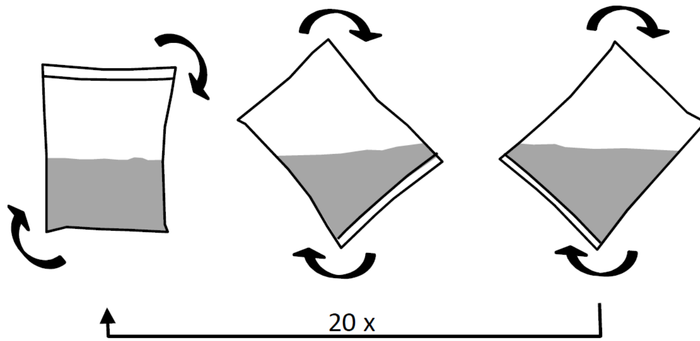
Örnek	% GD	MON 87701 Soya Miktarı %100 GD (g)	MIR604 Mısır Miktarı %100GD (g)	Mısır Unu Miktarı %0 GD (g)	Soya Unu Miktarı %0 GD (g)
HU-3A	2	0,30	0,30	14,70	14,70
HU-3B	0	0,00	0,00	15,00	15,00
Toplam		0,30	0,30	29,70	29,70

Tablo 3.4. Karışık GD çeşidi işlenmiş matris GD oranı ve miktarı

Örnek	%GD	MON87701 Soya Miktarı %100 GD (g)	MIR604 Mısır Miktarı %100 GD (g)	Mısır Unu Miktarı %0 GD (g)	Soya Unu Miktarı %0 GD (g)	Buğday unu Miktarı (g)	Şeker (g)	Tereyağ (g)	Yumurta (adet)
HU-4A	2	1,00	1,00	49,00	49,00	200,00	150,00	100,00	1
HU-4B	0	0,00	0,00	50,00	50,00	200,00	150,00	100,00	1
Toplam		1,00	1,00	99,00	99,00	400,00	300,00	200,00	2 Adet

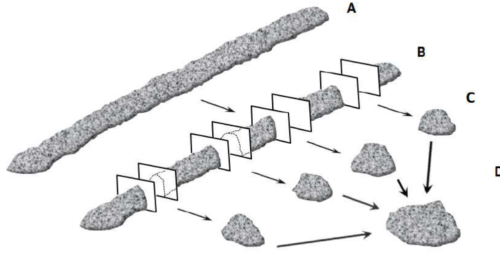
Referans malzeme ile GDO içermediği bilinen soya ve mısır unu uygun matrisi oluşturmak üzere matrislerin hazırlanması için materyal olarak kullanılacaktır. Avrupa Ortak Araştırma Merkezi (JRC) tarafından yayınlanan, GDO Analizlerinde örnek hazırlama rehberi[87] matris hazırlama işlemleri için temel dokümandır.

Bu amaçla sırasıyla, plastik torba yöntemi, blender ile karıştırma, uzun yığın metodu (long pile) ve son olarak kaşık metodu kullanılmıştır. Buna göre plastik torba metodunda 20 kere sağ ve sol yapılmak üzere farklı poşetteki unlar karıştırılır ve blendera aktarılır (Şekil 3.10.).



Şekil 3.1. Plastik torba metodu [87]

Blender ile homojenizasyon ve partikül boyutunu eşitlemek amacıyla 3 dk boyunca örnekler karıştırıldıktan sonra uzun yığın metoduna uygun olarak paçal edilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.2. Uzun yığın metodu [87]

İşlenmiş matris için bisküvi aşağıda verilen formüle göre hazırlanmıştır veyukarıdaki homojenizasyon için gerekli işlemler aynı şekilde uygulanmıştır.

Tablo 3.5. Bisküvi materyali formülasyonu

Malzeme	Miktar(g, adet)
Buğday Unu	200,00g
Mısır Unu*	50,00g
Soya Unu**	50,00g
Şeker	150,00g
Margarin	100,00g
Yumurta	1 Adet

*%100'lük MIR604 Mısır ve %0 GD Mısır ununun belli oranlarında karışımından hazırlanmıştır.
**%100'lük MON87701 Soya ve %0 GD Soya ununun belli oranlarında karışımından hazırlanmıştır.

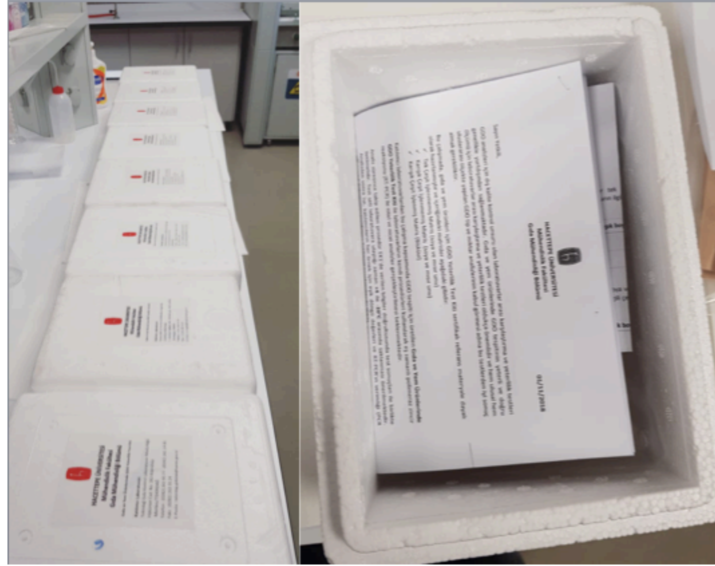
Karışık GD çeşidi işlenmiş matris materyalini oluştururken JRC IHCP biyoteknoloji ve GDO Birimi'nde üretilen teknik[59] esas alınmıştır. Malzemeler dikkatlice karıştırılmış, pişirme tepsisine homojen bir biçimde eşit olarak yayılmıştır. Önceden ıstılan fırında 10 dk süre ile 180°C'de pişirilmiştir. Fırından alındıktan sonra üstü kontaminasyondan kaçınmak sebebi ile örtülmüş ve oda sıcaklığında soğulmuştur. Soğuduktan sonra her bir pakette bir adet bisküvi bulunmak üzere vakum paketlenmiştir. Ürün sevkiyata kadar 4°C' de depolanmıştır [59].
Oluşturulan yeterlilik test kitlerinin dağıtım öncesi görselleri Şekil 3.3 – Şekil 3.5 arasında verilmiştir.



Şekil 3.3. Yeterlilik test kitinin içeriği



Şekil 3.4. Yeterlilik test kitinin strafor köpük kutulara yerleştirilmeden önceki hali



Şekil 3.5. Yeterlilik test kitinin strafor köpük kutulara yerleştirilip laboratuvara gönderilmeden önceki hali

3.2.1.3. Matrislerin Sertifikasyonu

- HU-1A;

%100 MIR604 içeren mısır unu AOCS 0607-A2, AOCS tarafından mısır tohumlarından hazırlanmıştır. AOCS 0607-A2, 27 mL'lik cam şişede yaklaşık 10 g malzeme mevcuttur. Bu referans materyal Syngenta Bitki Koruma şirketi,LLC tarafından sağlanan MIR604 mısır tohumlarından üretilmiştir. AOCS 0607-A2'nin hazırlanmasında kullanılan MIR604 mısır tohumu, MIR604 hattının kendi kendine tozlaşma döngülerinden üretilmiştir.

MIR604 ve herhangi bir GD çeşidini içermeyen GDO' suz mısır unu ticari bir şirketten sağlanmıştır. Bu iki unun ağırlık/ağırlık esasına göre belli oranda GDO içerecek şekilde homojen bir şekilde karıştırılması ile HU-1A (Tek GD Çeşidi İşlenmemiş Matris) elde edilmiştir.

HU-1A'da homojenliğin değerlendirilmesi için materyali oluşturan her partiden temsili sayıda rastgele seçim yöntemi kullanılarak numuneler alınmıştır. Çalışmada 4 biyolojik tekrar ve 4 teknik tekrar ile yürütülmüştür.

Numuneler 4°C' de depolanmış olup 6 aylık süre ile teslimat öncesi test edilmiştir. MIR604 çeşidine spesifik Real-time PCR ile nicel ve nitel analizleri yapılmıştır.

Bu matris tamamen gıda ve yem ürünlerinde GDO tespiti için yeterlilik testinde kullanım ve laboratuvarlar arası karşılaştırma amacıyla üretilmiştir.

- HU-2A;

%100 MON87701 içeren soya unu: AOCS 0809-A, AOCS tarafından soya fasülyesi devitalize tohumdan hazırlanmıştır. AOCS 0809-A, 27 mL'lik cam şişede yaklaşık 10 g malzeme mevcuttur. Bu referans materyalin Monsanto Şirketi tarafından teslim edilen MON87701 soya fasulyesi tohumundan (Üretim hattı: Orion Kimliği: 11214359) üretildiği bildirilmektedir. AOCS 0809-A'nın hazırlanmasında kullanılan MON87701 soya fasulyesi, MON87701 hattının çeşitli kendi kendine tozlaşma döngülerinden üretilmiştir.

MON87701 ve herhangi bir GD çeşidini içermeyen GDO' suz soya unu ticari bir şirketten sağlanmıştır. Bu iki unun ağırlık/ağırlık esasına göre belli oranda GDO içerecek şekilde homojen bir şekilde karıştırılması ile HU-2A (Tek GD Çeşidi İşlenmemiş Matris) elde edilmiştir.

HU-2A'da homojenliğin değerlendirilmesi için materyali oluşturan her partiden temsili sayıda rastgele seçim yöntemi kullanılarak numuneler alınmıştır. Çalışmada 4 biyolojik tekrar ve 4 teknik tekrar ile yürütülmüştür.

Numuneler 4°C' de depolanmış olup 6 aylık süre ile teslimat öncesi test edilmiştir. MON87701 çeşidine spesifik Real-time PCR ile nicel ve nitel analizleri yapılmıştır.

Bu matris tamamen gıda ve yem ürünlerinde GDO tespiti için yeterlilik testinde kullanım ve laboratuvarlar arası karşılaştırma amacıyla üretilmiştir.

- HU-3A;

%100 MON87701 içeren soya unu: AOCS 0809-A, AOCS tarafından soya fasülyesi devitalize tohumdan hazırlanmıştır. AOCS 0809-A, 27 mL'lik cam şişede yaklaşık 10 g malzeme mevcuttur. Bu referans materyalin Monsanto Şirketi tarafından teslim edilen MON87701 soya fasulyesi tohumundan (Üretim hattı: Orion Kimliği: 11214359) üretildiği bildirilmektedir. AOCS 0809-A'nın hazırlanmasında kullanılan MON87701 soya fasulyesi, MON87701 hattının çeşitli kendi kendine tozlaşma döngülerinden üretilmiştir.

%100 MIR604 içeren mısır unu AOCS 0607-A2, AOCS tarafından mısır tohumlarından hazırlanmıştır. AOCS 0607-A2, 27 mL'lik cam şişede yaklaşık 10 g malzeme mevcuttur. Bu referans materyal Syngenta Bitki Koruma şirketi,LLC tarafından sağlanan MIR604 mısır tohumlarından üretilmiştir. AOCS 0607-A2'nin hazırlanmasında kullanılan MIR604 mısır tohumu, MIR604 hattının kendi kendine tozlaşma döngülerinden üretilmiştir.

MON87701, MIR604 ve herhangi bir GD çeşidini içermeyen GDO' suz soya ve mısır unu ticari bir şirketten sağlanmıştır. Bileşimi 4 farklı unun ağırlık/ağırlık esasına göre belli oranda GDO içerecek şekilde homojen bir şekilde karıştırılması ile HU-3A (Karışık GD Çeşidi İşlenmemiş Matris) elde edilmiştir.
HU-3A'da homojenliğin değerlendirilmesi için materyali oluşturan her partiden temsili sayıda rastgele seçim yöntemi kullanılarak numuneler alınmıştır. Çalışmada 4 biyolojik tekrar ve 4 teknik tekrar ile yürütülmüştür.
Numuneler 4°C' de depolanmış olup 6 aylık süre ile teslimat öncesi test edilmiştir. MON87701 ve MIR604 çeşidine spesifik Real-time PCR ile nicel ve nitel analizleri yapılmıştır.
Bu matris tamamen gıda ve yem ürünlerinde GDO tespiti için yeterlilik testinde kullanım ve laboratuvarlar arası karşılaştırma amacıyla üretilmiştir.

- HU-4A;

%100 MON87701 içeren soya unu: AOCS 0809-A, AOCS tarafından soya fasülyesi devitalize tohumdan hazırlanmıştır. AOCS 0809-A, 27 mL'lik cam şişede yaklaşık 10 g malzeme mevcuttur. Bu referans materyalin Monsanto Şirketi tarafından teslim edilen MON87701 soya fasulyesi tohumundan (Üretim hattı: Orion Kimliği: 11214359) üretildiği bildirilmektedir. AOCS 0809-A'nın hazırlanmasında kullanılan MON87701 soya fasulyesi, MON87701 hattının çeşitli kendi kendine tozlaşma döngülerinden üretilmiştir.
%100 MIR604 içeren mısır unu AOCS 0607-A2, AOCS tarafından mısır tohumlarından hazırlanmıştır. AOCS 0607-A2, 27 mL'lik cam şişede yaklaşık 10 g malzeme mevcuttur. Bu referans materyal Syngenta Bitki Koruma şirketi,LLC tarafından sağlanan MIR604 mısır tohumlarından üretilmiştir. AOCS 0607-A2'nin hazırlanmasında kullanılan MIR604 mısır tohumu, MIR604 hattının kendi kendine tozlaşma döngülerinden üretilmiştir.
MON87701, MIR604 ve herhangi bir GD çeşidini içermeyen GDO' suz soya ve mısır unu ticari bir şirketten sağlanmıştır. Bileşimi 4 farklı unun ağırlık/ağırlık esasına göre belli oranda GDO içerecek şekilde homojen bir şekilde karıştırılması ve ısıl işlem görmesi sonucu HU-4A (Karışık GD Çeşidi İşlenmiş Matris) elde edilmiştir.
HU-4A'da homojenliğin değerlendirilmesi için materyali oluşturan her partiden temsili sayıda rastgele seçim yöntemi kullanılarak numuneler alınmıştır. Çalışmada 4 biyolojik tekrar ve 4 teknik tekrar ile yürütülmüştür.

Numuneler 4°C’ de depolanmış olup 6 aylık süre ile teslimat öncesi test edilmiştir.
MON87701 ve MIR604 çeşitlerine spesifik Real-time PCR ile nicel ve nitel analizleri yapılmıştır.
Bu matris tamamen gıda ve yem ürünlerinde GDO tespiti için yeterlilik testinde kullanım ve laboratuvarlar arası karşılaştırma amacıyla üretilmiştir.

3.2.2. DNA Ekstraksiyonu

3.2.2.1. DNA Ekstraksiyon Yöntemi

3.2.2.1.1. Örnekleme

DNA ekstraksiyonunda kullanılacak matrislerin örnekleme yöntemleri için 3.2.1.2. yeterlilik test kiti matrislerinin hazırlanması bölümünde görüleceği üzere Avrupa Birliği Ortak Araştırma Merkezi GDO Laboratuvarı “Guidelines for sample preparation procedures in GMO analysis” dökümanından yararlanılmıştır[87].

3.2.2.1.2. Kapsam ve Uygulanabilirlik

Foodproof® Sample Preparation Kit III, bitki ve hayvan kaynaklı çeşitli gıda örneklerinden (ham madde ve işlenmiş gıda) DNA izolasyonu için şirket tarafından optimize edilmiş olup kit ile elde edilen DNA'nın kalitesi, herhangi bir PCR sistemi kullanılarak niteliksel ve niceliksel uygulamalar için oldukça uygun bulunmuştur. Çalışmamızda bu DNA ekstraksiyon kiti kullanılmıştır.

3.2.2.1.3. Prensip

DNA ekstraksiyonunun temel prensibi önce matriste bulunan DNA'yı sulu solüsyona ve PCR inhibitörlerinden DNA'nın daha fazla saflaştırılmasına bırakmayı içerir. Ekstraksiyon tamponu ile termal liziz başlar ve bunu takiben proteinaz K ile enzimatik sindirim sağlanır. İzopropanol eklendikten sonra bağlayıcı tamponun da etkisi ile kontaminantlar filtre tüpündeki filtre düzeneğinden geçerken DNA filtrede kalır. Süpernatantın atılmasıyla ve etanol ile yıkanmasından sonra artık kontaminantlar uzaklaşmıştır. Elüsyon tamponunda filtrede kalan DNA çözülerek 50 mikrolitrelik DNA özütü elde edilmiş olur.

3.2.2.1.4. DNA Ekstraksiyonu Kit Kullanım Prosedürleri

1) 200 mg homojenize numuneye (2 ml mikrosantrifüj tüplerinde) 1 ml Ekstraksiyon Tamponu (şişe 1, kırmızı kapak) ekleyin. 30 saniye vortekslenir. 80°C'de 30 dakika inkübe edilir.

İnkübasyon esnasında tüpü ters çevirerek 2-3 kez karıştırılır. Matris Ekstraksiyon Tamponunu emerse, ek tampon eklenir.

2) 12000 g'de 10 dakika santrifüjlenir.

3) Yeni bir 2 ml mikrosantrifüj tüpüne 400 µL Bağlama Tamponu (şişe 2, yeşil kapak) eklenir.

4) Bağlama Tamponu eklenmiş 2 ml lik santrifüj tüpüne 600 µL supernatant aktarılır, yukarı ve aşağı pipetleyerek nazik bir şekilde karıştırılır. 80µL Proteinaz K çalışma solüsyonu eklenir (100 mg / 5 ml ddH2O) ve yavaşça yukarı ve aşağı pipetleyerek iyice karıştırılır. 72°C'de 10 dakika inkübasyona bırakılır.

5) 200 µL izopropanol eklenir. Yukarı, aşağı pipetleyerek iyice karıştırılır.

6) Karışımı 650 µL olmak üzere birleştirilmiş Filtre Tüpü-Toplama Tüpünün üst haznesine pipetlenir.

7) 5000 g'de 1 dakika santrifüjlenir.

8) Koleksiyon tüpüne geçen akıntı boşaltılır ve filtre tüpü yeni bir koleksiyon tüpü içerisine yerleştirilir.

• Eğer tüpün içerisinde karışım artmışsa aynı filtre tüpüne bu karışım aktarılır ve tekrar aynı koşullarda santrifüj edilir.

Eğer DNA'nın toplanması(pool) gerekiyorsa 6. ve 7. Aşamalar ek örnek hazırlamaları ile tekrarlanabilir.

9) Koleksiyon tüpüne geçmiş akıntıyı boşaltın ve filtre tüpünü tekrar koleksiyon tüpüne yerleştirilir. 450 µL Yıkama tamponu çalışma solüsyonunu (şişe 3, mavi kapak) üst hazneye eklenir ve 5000 g'de 1 dakika santrifüjlenir.

10) Koleksiyon tüpüne geçmiş akıntı dökülür ve 9. aşama tekrarlanır.

11) Koleksiyon tüpüne geçmiş akıntı boşaltılır ve maksimum hız veya 13000 g'de Yıkama Tamponunu uzaklaştırmak için 10 saniye santrifüjlenir.

12) Filtre Tüpünü temiz bir 1,5 ml'lik reaksiyon tüpüne yerleştirilir. Önceden ısıtılmış (70 ° C) 50 µL Elüsyon Tamponu (şişe 4, renksiz kapak) filtre tüp içerisinde bulunan cam elyafına doğru aktarılır ve 15-20°C'de 5 dakika inkübe edilir.

13) 5000 g’de 1 dakika santrifüj edilir.

14) Mikrosantrifüj tüpü yukarıda sıralanan işlemler sonucunda elüte edilmiş DNA’yı içermektedir.

3.2.2.1.5. DNA Ekstraksiyon Metodunun Deneysel Test Edilmesi

Deneysel testin amacı, DNA ekstraksiyon yönteminin, amaçlanan hedef için uygun miktar ve kalitede DNA sağladığını doğrulamaktır.

DNA ekstraksiyon metodunun, çeşide spesifik analit ve referans analitin ölçülmesi aşamasında uygun kalitede ve nicelikte DNA elde edilmesi gerekmektedir.

Biotecon foodproof Sample Preperation Kit III için belirtilen prosedürler takip edilerek, AOCS’den sağlanan AOCS 0407-A ve AOCS 0607-A2 mısır ile AOCS 0906-A ve AOCS 0809-A soyadan DNA ekstraksiyon yöntemi test edilmiştir. Bu DNA’ların %1 ve %0,1 GD içerecek şekilde hazırlanmaları sonrası 1:1, 1:4, 1:16, 1:64, 1:256 şeklinde dilüsyonlarının RT-PCR’da nitel analiz yapılarak inhibisyonu test edilmiştir.

3.2.3. Tek Laboratuvar GDO Analizi

3.2.3.1. Genel Bilgi ve Metadolojinin Özeti

MIR604 çeşidi protokolü; örnekteki MIR604 olayının toplam mısır içeriğine olan oranın belirlenmesini sağlayan çeşide spesifik RT-PCR TaqMan® nicel analiz prosedürünü tanımlar.

Uygun yöntemlerle ekstrakte edilmiş DNA, PCR analizinde kullanılmadan önce kalite ve miktar açısından test edilmiştir. Ayrıca PCR inhibitörlerinin varlığının ortaya koyulması maksadı ile 1:1, 1:4, 1:16, 1:64, 1:256 olmak üzere 4 dilüsyon ile inhibisyon testi yapılmıştır.

MIR604 çeşidi DNA’sının spesifik bir şekilde saptanması için, insert ve bitki genomu (5 'komşu DNA bölgesinde yer alan) arasındaki rekombinasyon bölgesinin 76 baz çiftinden oluşan parçası, iki spesifik primer kullanılarak çoğaltılır. PCR ürünleri, her bir döngüde (gerçek zamanlı), iki floresan boya ile işaretlenmiş, hedefe spesifik bir oligonükleotid probu ile ölçülür. Bunlardan FAM 5’ ucunda bir raportör boya ve BHQ-1 ise onun 3’ ucunda bir söndürücü boya olarak görev yapar. Orjinal metotta kullanılan sönümleyici boya TAMRA olup bu çalışmada BHQ-1 kullanılarak orjinal metot modifiye edilmiştir.

MIR604 DNA'sının relatif nicel analizi için, mısır endojen alkol dehidrojenaz geni (Adh1), bir çift spesifik primer kullanılarak, Yakima Yellow raportör ve TAMRA sönümleyici boya olacak şekilde bir prob ile işaretlenerek 135 baz çiftlik bir bölge yukarıdaki gibi çoğaltılır. Orjinal metotta raportör boya olarak VIC kullanılmasına karşı bu çalışmada VIC yerine Yakima Yellow kullanılarak orjinal metot modifiye edilmiştir.

Ölçülen floresan sinyali, belirli sayıda döngüden sonra bir eşik değerini geçer. Bu eşik döngüsü “Ct” veya “Cq” değeri olarak adlandırılır. Bir test numunesindeki MIR604 DNA çeşidi miktarının belirlenmesi için, kalibrasyon örneklerinin standartlaştırılmış ΔCt değerleri kullanılarak, referans eğri ΔCt formülünden lineer regresyon ile hesaplanır. Bilinmeyen numunelerin standartlaştırılmış ΔCt değerleri ölçülür ve regresyon formülü ile MIR604 çeşidi DNA'sının relatif miktarı tahmin edilir.

MON87701 çeşidi protokolü; örnekteki MON87701 olayının toplam mısır içeriğine olan oranın belirlenmesini sağlayan çeşide spesifik RT-PCR TaqMan® nicel analiz prosedürünü tanımlar.

Uygun yöntemlerle ekstrakte edilmiş DNA, PCR analizinde kullanılmadan önce kalite ve miktar açısından test edilmiştir. Ayrıca PCR inhibitörlerinin varlığının ortaya koyulması maksadı ile 1:1, 1:4, 1:16, 1:64, 1:256 olmak üzere 4 dilüsyon ile inhibisyon testi yapılmıştır.

MON87701 çeşidi DNA’sının spesifik bir şekilde saptanması için, insert ve bitki genomu (5'komşu DNA bölgesinde yer alan) arasındaki rekombinasyon bölgesinin 89 baz çiftinden oluşan parçası, iki spesifik primer kullanılarak çoğaltılır. PCR ürünleri, her bir döngüde, iki floresan boya ile işaretlenmiş, hedefe spesifik bir oligonükleotid probu ile ölçülür. Bunlardan 6-FAM 5’ ucunda bir raportör boya ve BHQ-1 ise onun 3’ ucunda bir söndürücü boya olarak görev yapar. Orjinal metotta sönümleyici boya olarak TAMRA kullanılmış olup bu çalışmada BHQ-1 boya kullanılarak modifikasyon yapılmıştır.

MON87701 DNA'sının relatif nicel analizi için, soya endojen lektin geni (le1), bir çift spesifik primer kullanılarak, 6-FAM raportör ve BHQ-1 sönümleyici boya olacak şekilde bir prob ile işaretlenerek 74 baz çiftlik bir bölge yukarıdaki gibi çoğaltılır. Orjinal yöntem de sönümleyici boya olarak TAMRA kullanılmasına karşın bu çalışmada boya olarak BHQ-1 kullanılmış olup orjinal yöntem modifiye edilmiştir.

Ölçülen floresan sinyali, belirli sayıda döngüden sonra bir eşik değerini geçer. Bu eşik döngüsü “Ct” veya “Cq” değeri olarak adlandırılır.

Test edilecek örnekteki MON87701 miktarını belirlemek için MON87701 Ct değeri ve lektin geninin Ct değeri standart bir değer için karar alınmıştır. Bu değerler ile standart eğri oluşturulup buradaki veriler kullanılarak MON87701 DNA’sının toplam soya DNA’sına oranını tahmin edilir.

3.2.3.2. Metot Performans Özellikleri

3.2.3.2.1. Genel

Yöntem mısır unundan ve soya unundan uygun olarak ekstrakte edilmiş DNA için optimize edilmiştir. Yöntemin tekrarlanabilirliği ve doğruluğu, farklı GDO içeriklerinde DNA örnekleri kullanılarak tek laboratuvar analizleri ile test edilmiştir.

3.2.3.2.2. Laboratuvar İçi Çalışma

MIR604 için yöntem, Avrupa Komisyonu Ortak Araştırma Merkezi (JRC) GD Gıda ve Yem için Avrupa Birliği Referans Laboratuvarı tarafından uluslararası karşılaştımalı bir çalışmada doğrulanmış olup bu çalışma Aralık 2006'da 14 laboratuvar ile gerçekleştirilmiştir. Bu tez kapsamında daha önce validasyonu yapılan bu yöntemin verifikasyonu gerçekleştirilmiştir.

MON87701 için yöntem, GD Gıda ve Yem için Avrupa Birliği Referans Laboratuvarı tarafından uluslararası karşılaştırmalı bir çalışmada validasyonu gerçekleştirilmiş ve bu çalışma Kasım 2009’da 12 laboratuvar ile yapılmıştır. Bu çalışma kapsamında, daha önce valide edilen bu yöntemin verifikasyonu yapılmıştır. Roundup Ready® soya ile nitel ve nicel saptama yöntemleri için yapılan laboratuvar içi metot performans değerlendirme çalışmasından bu aşamada yararlanılmıştır[88].

3.2.3.2.3. Moleküler Spesifiklik

MIR604 için yöntem, insert ve bitki genomu arasındaki rekombinasyon bölgesinde benzersiz bir DNA dizisini kullanır. Sekans, MIR604 olayına özgüdür, böylece yönteme de çeşide spesifiklik kazandırır.

Doğrulanmış yöntemde MIR604 (ileri/geri oligonükleotid primer ve prob) MON810, Bt11, Bt176, GA21, NK603 çeşitlerinin de bulunduğu test düzeneğinde RT-PCR ile yanlış pozitiflik yalnızca yöntem validasyonu sırasında ölçülmüştür.

MON87701 için yöntem, insert ve bitki genomu arasındaki rekombinasyon bölgesinde benzersiz bir DNA dizisini kullanır. Sekans, MON87701 çeşidine özgüdür, böylece yönteme de çeşide-spesifiklik kazandırır.

MON87701 çeşidine spesifik RT-PCR'da 200 ng genomik DNA kullanılarak kolza tohumu olarak; RT73, RT200; mısır olarak ise GA21, NK603, MON 810, MON 863, MON 88017, LY038, MON 89034, MON 87460; pamuk çeşitleri ise MON 531, MON 15985, MON 1445, MON 88913; soya çeşidi olarak 40-3-2, MON 89788; buğday olarak MON 71800 ve tüm bu çeşitlerin GD olmayan yabani tipleri metot sağlayıcı tarafından test edilmiştir. Metot sağlayıcısı tarafından test edilen numunelerde MON87701 dışında hiç bir GD çeşidi için saptanabilir bir amplifikasyon gözlenmemiştir. Burada yöntem validasyonu sırasında elde edilen verilere dayanarak, hazırlanan matrislerin laboratuvarlara gönderilmesi aşamasında 40-3-2, MON89788 ve MON87701 soya aranacak GD çeşitleri arasına yerleştirilmiştir.

3.2.3.3. Prosedür

3.2.3.3.1. RT-PCR Nicel Analiz

3.2.3.3.1.1. Genel

Taksona özgü referans sekans (Adh1) ve GDO (MIR604) hedef sekansı için PCR kurulumu, ayrı flakonlarda gerçekleştirilmiştir.

Reaksiyon başına 50 ng/μL DNA kuyucuklara yüklenmiştir.

Reaksiyon başına 20 μL olan karışım Tablo 3.6. ve Tablo 3.7.' de detaylı bir şekilde gösterilmiştir.

Taksona özgü referans sekans (le1) ve GDO (MON87701) hedef sekansı için PCR kurulumu, ayrı flakonlarda gerçekleştirilmiştir.

Reaksiyon başına 50 ng/μL DNA kuyucuklara yüklenmiştir.

Reaksiyon başına 20 μL olan karışım Tablo 3.8. ve Tablo 3.9.' da detaylı bir şekilde gösterilmiştir.

3.2.3.3.1.2. Kalibrasyon

MIR604 çeşidi için kalibrasyon eğrisi, toplam 250 ng mısır DNA'sında sabit yüzdeli MIR604 DNA içeren beş örnekten oluşur. Standart numunelerin GD içeriği% 10 ve % 0.1 arasında değişmektedir.

Kalibrasyon eğrisi, kalibrasyon örneklerinin ΔCt'sine karşılık beklenen %GD değerlerinin logaritması işaretlenerek üretilir. Kalibrasyon eğrisinin eğimi (a) ve

kesişmesi (b) olmak üzere (y=ax+b) içeriği bilinmeyen örneğin standartlaştırılmış ∆Ct değerleri kullanılarak %GD içeriği bulunur.

MON87701 çeşidi için standart eğriler 5 örnekten oluşmaktadır. Kalibrasyon eğrilerinin birinci noktası, toplam 200 ng soya fasulyesi DNA'sında % 9 MON 87701 içeren soya fasulyesi DNA'sıdır (1.13 pg haploit soya genomik DNA'sı yaklaşık 176,991 soya fasulyesi genom kopyası içerir) Diğer dört standart numune, seri dilüsyon ile hazırlanır.

Kalibrasyon noktaları için hedef kopya sayısının logaritmasına karşı Ct değerleri çizilerek bir kalibrasyon eğrisi oluşturulur. Bu işlem Excel vb. Programlar kullanılarak hesaplanılabildiği gibi laboratuvarımızda Roche Lightcycler 96 RT-PCR'ın sağlamış olduğu yazılımdan veriler otomatik bir şekilde elde edilmiştir.

Bilinmeyen örneğin DNA için ölçülen kopya numarası, standart eğrilerden enterpolasyon yapılarak elde edilir.

3.2.3.3.1.3. RT-PCR Hazırlanması

MIR604 çeşidi için;

1. Çalışma için gerekli olan bileşenler yavaşça karıştırılıp santrifüjlendi.

Çözülmüş reaktifler buz üzerinde tutulmuştur.

2. Buz üzerinde iki reaksiyon tüpünde (biri MIR604 sistemi ve bir Adh1 sistemi için), mastermiks hazırlamak için aşağıdaki bileşenleri (Tablo 3.6. ve Tablo 3.7.) aşağıda belirtilen sıraya (DNA hariç) eklendi.

Tablo 3.6. Mısır Adh1 referans sistemi için reaksiyon başına son hacim / konsantrasyonda amplifikasyon reaksiyon karışımı

Bileşen	**Son konsantrasyon**	**µL/reaksiyon**
LightCycler® 480 Probes Master (2x)	1x	10,000µL
Adh1 İleri Primer	20µM	0,300µL
Adh1 Geri Primer	20µM	0,300µL
Adh1 Prob	20µM	0,200µL
ddH2O		4,200µL
Eklenecek DNA Miktarı	50ng/µL	5,000µL
Toplam Reaksiyon Hacmi		20,000µL

Tablo 3.7. MIR604'e özgü sistem için reaksiyon başına son hacim /konsantrasyonda amplifikasyon reaksiyon karışımı

Bileşen	**Son konsantrasyon**	**µL/reaksiyon**
LightCycler® 480 Probes Master (2x)	1x	10,000µL

MIR604 İleri Primer	20µM	0,600µL
MIR604 Geri Primer	20µM	0,300µL
MIR604 Prob	20µM	0,200µL
ddH2O		3,900µL
Eklenecek DNA Miktarı	50ng/µL	5,000µL
Toplam Reaksiyon Hacmi		20,000µL

3. Yavaşça karıştırılıp kısaca santrifüjlendi.
4. Test edilecek her bir DNA numunesi için iki reaksiyon tüpü (biri MIR604 ve diğeri Adh1 mastermiks için bir tane) hazırlandı.
5. Her reaksiyon tüpüne doğru miktarda mastermiks eklendi (üç PCR tekrarı için 15 x 3 = 45 ul mastermiks). Her bir tüpe doğru miktarda DNA eklendi (örneğin, üç PCR tekrarı için 5 x 3 = 15 µl DNA). Her tüp yaklaşık olarak 5 sn düşük hızda vortekslendi.
6. Her kuyucukta toplamda 20µL DNA ile birlikte karışım bulunur. Reaksiyon karışımını aşağıda toplamak amaçlı levha düşük hızda santrfüjlendi (1 dakika için yaklaşık 250 x g).
7. Plate cihaza yüklendi.
8. Tablo 3.11'de ki döngü parametreleri dikkate alınarak PCR çalıştırımıştır.

MON87701 çeşidi için;

1. Çalışma için gerekli olan bileşenler yavaşça karıştırılıp santrifüjlendi.

Çözülmüş reaktifler buz üzerinde tutulmuştur.

2. Buz üzerinde iki reaksiyon tüpünde (biri MON87701 sistemi ve bir le1 sistemi için), mastermiks hazırlamak için aşağıdaki bileşenleri (Tablo 3.8. ve Tablo 3.9.) aşağıda belirtilen sıraya (DNA hariç) eklendi.

Tablo 3.8. Soya Le1 referans sistemi için RT-PCR reaksiyon başına son hacim / konsantrasyonda amplifikasyon reaksiyon karışımı

Bileşen	**Son konsantrasyon**	**µL/reaksiyon**
LightCycler® 480 Probes Master (2x)	1x	10,000µL
Le1 İleri Primer	20 µM	0,375µL
Le1 Geri Primer	20µM	0,375µL
Le1 Prob	20µM	0,125µL
ddH2O		5,125µL
Eklenecek DNA Miktarı	50ng/µL	4,000µL
Toplam Reaksiyon Hacmi		20,000µL

Tablo 3.9. MON87701'e özgü sistem için RT-PCR reaksiyon başına son hacim /konsantrasyonda amplifikasyon reaksiyon karışımı

Bileşen	Son konsantrasyon	µL/reaksiyon
LightCycler® 480 Probes Master (2x)	1x	10µL
MON87701 İleri Primer	20 µM	1,5µL
MON87701Geri Primer	20µM	1,5µL
MON87701Prob	20µM	0,625µL
ddH2O		2,375µL
Eklenecek DNA Miktarı	50ng/µL	4µL
Toplam Reaksiyon Hacmi		20,000µL

3. Yavaşça karıştırılıp kısaca santrifüjlendi.
4. Test edilecek her bir DNA numunesi için iki reaksiyon tüpü (biri MON87701 ve diğeri Le1 mastermiks için bir tane) hazırlandı.
5. Her reaksiyon tüpüne doğru miktarda mastermiks eklendi (üç PCR tekrarı için 16 x 3 = 48 ul mastermiks). Her bir tüpe doğru miktarda DNA eklendi (örneğin, üç PCR tekrarı için 4 x 3 = 12 µl DNA). Her tüp yaklaşık olarak 5 sn düşük hızda vortekslendi.
6. Her kuyucukta toplamda 20µL DNA ile birlikte karışım bulunur. Reaksiyon karışımını aşağıda toplamak amaçlı levha düşük hızda santrfüjlendi (1 dakika için yaklaşık 250 x g).
7. Plate cihaza yüklendi.
8. Tablo 3.10'daki döngü parametreleri dikkate alınarak PCR çalıştırılmıştır.

Tablo 3.10. Soya MON87701/Le1 sistemleri için RT-PCR döngü programı

Basamak	Aşama		Sıcaklık (°C)	Süre (s)	Sinyal Alımı	Döngüler
1	UNG		50°C	120	Hayır	1
2	Başlangıç Denatürasyonu		95°C	600	Hayır	1
3	Amplifikasyon	Denatürasyon	95°C	15	Hayır	45
		Yapışma&Uzama	60°C	60	Evet	

Tablo 3.11 Mısır MIR604/Adh1 sistemleri için RT-PCR döngü programı

Basamak	Aşama		Sıcaklık (°C)	Süre (s)	Sinyal Alımı	Döngüler
1	UNG		50°C	120	Hayır	1
2	Başlangıç Denatürasyonu		95°C	600	Hayır	1
3	Amplifikasyon	Denatürasyon	95°C	15	Hayır	40
		Yapışma&Uzama	60°C	60	Evet	

3.2.3.4. Verifikasyon Parametreleri

Kullanılan metot ENGL tarafından yayınlanmış referans bir metot olması nedeniyle yalnızca metodu uygulamaktaki yeterliliğin değerlendirilmesi amacıyla verifikasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Verifikasyon çalışmalarında performans belirleyici kriter olarak aşağıda sıralanan başlıklar seçilmiştir:

- Yanlış Pozitif Oranı
- Yanlış Negatif Oranı
- Yanlış Pozitif Oranı
- Yanlış Negatif Oranı
- İnhibisyon Testi
- LOD
- Doğruluk (Trueness)
- Tekrarlanabilirlik
- LOQ kriterleri seçilmiştir

3.2.3.4.1. Yanlış Pozitif Oranı

MIR604 çeşidi için;
İçerisinde mısır bulunmadığı bilinen örnekler ile çalışılır. Mısır aranması çalışmasında matriks olarak soya seçilmiştir. Seçilen soya numunesinin GDO Event spesifik analizi yapılarak GDO negatif olduğu tespit edilmiştir. Bir analist 3 biyolojik tekrar 2 teknik tekrar ile çalışma yapılmıştır.

Çeşide spesifik (MIR604) yanlış pozitif aranması; yanlış negatif çalışmasında MIR604 içermeyen mısırdan elde edilmiş izolatlar seçilmiştir. Tek analist 3 biyolojik tekrar 2 teknik tekrar ile çalışma yapılmıştır.

MON87701 için;
İçerisinde soya bulunmadığı bilinen örnekler ile çalışılır. Soya aranması çalışmasında matriks olarak mısır seçilmiştir. Bir analist 3 biyolojik tekrar 2 teknik tekrar ile çalışma yapılmıştır.

Çeşide spesifik (MON87701) yanlış pozitif aranması; yanlış negatif çalışmasında MON87701 içermeyen soyadan elde edilmiş izolatlar seçilmiştir. Tek analist 3 biyolojik tekrar 2 teknik tekrar ile çalışma yapılmıştır.

Yanlış pozitiflik testi için kabul edilebilir değer ≤%5’dir[89].

3.2.3.4.2. Yanlış Negatif Oranı

MIR604 çeşidi için;
İçerisinde mısır veya MIR604 geni bulunduğu bilinen örnekler ile çalışılır. Bu değer ≤%5 olmalıdır [80]. Mısır aranması ve spesifik MIR604 aranması

yanlış negatif çalışmasında %1 MIR604 ve ve %0,5 MIR604 içeren (kantitasyon çalışmasında da kullanılan) izolatlar seçilmiştir. Bir analist 4 ayrı izolat 8 replike toplam 32 çalışma yapılmıştır.

MON87701 çeşidi için;
İçerisinde Soya veya MON87701 geni bulunduğu bilinen örnekler ile çalışılır. Bu değer ≤%5 olmalıdır [89]. Soya aranması ve spesifik MON87701 aranması yanlış negatif çalışmasında %1 MON87701 ve ve %0,1 MON87701 içeren (kantitasyon çalışmasında da kullanılan) izolatlar seçilmiştir. Bir analist 4 ayrı izolat 8 replike toplam 32 çalışma yapılmıştır.

3.2.3.4.3. İnhibisyon Testi

MIR604 çeşidi için;
İnhibisyon testi, LOQ ve LOD analizlerinde kullanılmak üzere hedef gen açısından negatif olan GD olmayan mısır AOCS 0407-A (%0) ve hedef gen açısından pozitif olan AOCS 0607-A2 (%100) Sertifikalı Referans Materyalden izole edilen DNA'lar kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

MON87701 çeşidi için;
İnhibisyon testi, LOQ ve LOD analizlerinde kullanılmak üzere hedef gen açısından negatif olan GD olmayan Soya AOCS 0906A (%0) ve hedef gen açısından pozitif olan AOCS 0809A (%100) Sertifikalı Referans Materyalden izole edilen DNA'lar kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

2 GD çeşitinden de izole edilen her DNA 4 kere ¼ oranında dilüsyon edilmiştir. Bu sayede 1:4,1:16,1:64,1:256 olacak şekilde dilüsyonlar elde edilir. Analiz sırasında her bir örnekten iki paralel olacak şekilde referans gen bölgesi için PCR karışımı hazırlanmıştır.

Çalışmada kullanılan kabul kriterleri kontrolü için 4 dilüsyon DNA'sı kullanılarak bir standart eğri elde edilmiştir. Standart eğrinin R^2 değeri ≥ 0.98 ve eğim değeri(slope) ≤-3.1 ile ≤ -3.6 arasında olmalıdır. Ayrıca kullanım dilüsyonu için beklenen Ct değerleri ile ölçülen Ct değerleri karşılaştırılır. ∆Ct olarak adlandırılan bu fark ≤0.5 olmalıdır [89].

3.2.3.4.4. Minimum Tespit Sınırı (LOD)

Bir metodun hedef gen bölgesini saptayabildiği en küçük DNA kopya sayısıdır.

MIR604 çeşidi için;
Uygulamalı LOD saptanması için %0.045 düzeyli MIR604 hedef gen bölgesini içeren DNA'lar hedef gen bölgesinden toplamda 20, 10, 8 ve 5

kopya içerecek şekilde hazırlanmıştır. Daha sonra bu DNA’lar üçerli tekrarlar halinde çalışılmış ve tamamında hedef gen bölgesinin (MIR604) varlığı tespit edilmeye çalışılmıştır. Onarlı tekrarların tamamında tespit doğru şekilde yapılana kadar DNA’lar kopya sayıları düşükten büyüğe olacak şekilde test edilmiştir. Kopya sayısı hesaplamasının nasıl yapıldığı aşağıda verilmiştir.

ENGL metodunda mısırın 1 genom ağırlığı 2,725 pg olarak verilmiştir[89].

Mısırın 1 genom ağırlığı 2 ,725 pg ise 1000 pg (1 ng) Mısır DNA’sında 1000/2,725 = 366,97 kopya mısır genomu vardır. Elde ettiğimiz mısır DNA’sının 50 ng yoğunluğu olduğu varsılayarak, 50 x 366,97 = 18348,5 kopya mısır genomu olduğu hesaplanmıştır. Toplam mısır genomu içerisinde aradığımız hedef GD dizisinin %0,5olduğunu varsayılarak 50 ng yoğunlukta %0,5 hedef GD dizisi bulunan CRM’den elde edilmiş izolatta 18348,5 / 1000= 18,34 kopya hedef GD dizisi bulunmaktadır.

%0,1’lik hedef GD düzeyi %0,045’lik hedef GD düzeye indirildiğinde (0,45 birim mısır hedef GD dizisi içeren DNA ile 0,55 birim mısır hedef GD dizisi içermeyen mısır (Non-GM, Blank) DNA’sı karıştırılarak 1 birim %0,045 hedef GD dizisi içeren DNA elde edilir. Her iki DNA da aynı konsantrasyonda olmalıdır) 18,34 kopya x 0,45 =8,25 ≈ 8 kopya hedef GD dizisi içeren mısır DNA elde edilmiş olur.

MON87701 için;

Uygulamalı LOD saptanması için %0.045 düzeyli MON87701 hedef gen bölgesini içeren DNA’lar hedef gen bölgesinden toplamda 20, 10,8 ve 5 kopya içerecek şekilde hazırlanmıştır. Daha sonra bu DNA’lar üçerli tekrarlar halinde çalışılmış ve tamamında hedef gen bölgesinin (MON87701) varlığı tespit edilmeye çalışılmıştır. Üçerli tekrarların tamamında tespit doğru şekilde yapılana kadar DNA’lar kopya sayıları düşükten büyüğe olacak şekilde test edilmiştir. Kopya sayısı hesaplamasının nasıl yapıldığı aşağıda verilmiştir.

ENGL metodunda soyanın 1 genom ağırlığı 1,13 pg olarak verilmiştir[89].

1 genom soya 1,13 pg ise 1000 pg (1 ng) soya DNA’sında 1000/1,13 = 884,95 kopya soya genomu vardır. Elde ettiğimiz soya DNA’sının 50 ng yoğunluğu olduğunu varsayılarak 50x884,95 = 44247,5 kopya soya genomu olduğunu buluruz. 50 ng yoğunlukta %0,1’lik hedef GD

(MON87701) içeren izolatta 44247,5 / 1000= 44,25 kopya hedef GD dizisi bulunmaktadır. %0,1'lik Hedef GD düzeyi %0,045'lik Hedef GD düzeye indirildiğinde (0,45 birim soya Hedef GD dizisi içeren DNA ile 0,55 birim soya hedef GD dizisi içermeyen soya (Non-GM-Blank) DNA'sı karıştırılarak 1 birim %0,045 hedef GD dizisi içeren DNA elde edilir. Her iki DNA da aynı konsantrasyonda olmalıdır) 44,25 kopya x 0,45 =19,91 ≈ 20 kopya/µl hedef GD dizisi içeren soya DNA elde edilmiş olur.

3.2.3.4.5. Doğruluk

MIR604 için;

Doğruluk çalışması %1'lik, %0,5'lik DNA'lar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kalibrasyon eğrisi çizdirmek için Tablo 3.12.' de verilen düzeyler, doğruluk için ise %1 ve %0,5 düzeyleri kullanılmıştır. Tablo 3.12.'de ilgili validasyon raporunda belirtilen 250 ng'lık kalibrasyon eğrisi çizdirmede kullanılan MIR604 düzeyleri verilmiştir.

Tablo 3.12. Standart eğri numunelerinin% GD değerleri

Örnek Kodu	S1	S2	S3	S4	S5
Reaksiyondaki toplam DNA miktarı(ng/5µL)	250	250	250	250	250
%GD (DNA/DNA)	10	5	1	0,5	0,1

Tablo 3.12.'de yer alan değerler kullanılarak hedef GD (MIR604) bölgesi için bir standart eğri hazırlanmıştır. Yine her iki gen bölgesi için %1 ve %0,5 oranında GDO (MIR604) içeren DNA'lar kullanılarak iki farklı düzeyden 4 farklı PCR tekrarı için PCR karışımı hazırlanmış ve numune olarak analiz edilmiştir.

MON87701 için;

Doğruluk çalışması çalışması %9, %1 ve %0,1 MON87701 içerdiği bilinen DNA'lar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. %9'luk DNA standart eğri çizimi için kullanılırken, %1 ve %0.1 düzeyindeki DNA'lar uygulamalı LOQ belirlenmesinde numune olarak kullanılmıştır. %10'luk DNA kullanılarak Tablo 3.13.'de gen kopya sayıları ve DNA miktarları belirtilen bir seri dilüsyon hazırlanmıştır.

Tablo 3.13.'de yer alan değerler kullanılarak hedef GD (MON87701) bölgesi için bir standart eğri hazırlanmıştır. Yine her iki gen bölgesi için %1 ve %0,1

oranında GDO (MON87701) içeren DNA'lar kullanılarak iki farklı düzeyden 4 farklı PCR replikesi için PCR karışımı hazırlanmış ve numune olarak analiz edilmiştir.

Burada kabul kriteri, gerçek değerin (CRM değeri) ±%25'i olmalı

Tablo 3.13. Standart eğri numunelerinin% GD değerleri

Örnek Kodu	S1	S2	S3	S4	S5
Reaksiyondaki toplam DNA miktarı(ng/4µL)	200	66,7	22,2	7,41	1,48
Soya fasulyesi genom kopya sayısı	176991	58997	19666	6555	1311
MON87701 GD soya fasulyesi genom kopya sayısı	15929	5310	1770	590	118

3.2.3.4.6. Tekrarlanabilirlik

MIR604 çeşidi için; %1 ve %0,5 içeren düzeylerin her biri için ayrı ayrı hesaplanmıştır.

MON87701 çeşidi için %1 ve %0,1 içeren düzeylerin her biri için ayrı ayrı hesaplanmıştır.

Kabul kriteri olarak Rölatif Standart Sapma RSDr ≤25 olarak açıklanmıştır[89].

3.2.3.4.7. Minimum Ölçüm Sınırı (LOQ)

LOQ relatif (%) veya absolut (kopya sayısı) olarak hesaplanabilir.

Relatif LOQ (LOQrel): Pozitif kontrol materyali örneğin %0,1 konsantrasyonunda 3 PCR tekrarı olacak şekilde analiz edilir. 3 tekrar hedef GD ve 3 tekrarda referans gen analiz edilir.

Absolut LOQ (LOQabs): Bilinen pozitif kontrolden (ör:%1) dilüsyon serileri oluşturulur ve 3 PCR tekrarı yapılır (60,40,20,10,8, 5 ve 1 kopya yapılmıştır). LOQabs RSD'nin <%25 olduğu son dilüsyon serisidir. Çalışmamızda LOQabs yöntemi kullanılmıştır.

3.2.3.4.8. Tekrar Üretilebilirlik

Bu terim test sonuçlarının, aynı metot kullanılarak, benzer test numunelerinin farklı laboratuvarlarda, farklı personel ve cihazlar ile elde edildiği koşullardır [77]. Çalışmada tek analist, tek cihaz olup; bu tanım ileriki ölçüm belirsizliği hesaplamak için modifiye edilmiştir. Bu nedenle tekrar üretilebilirlik, doğruluk ve

RSDr hesabında kullanılan veriler kullanılarak hesaplanmıştır ve aynı örneklerin ikinci ölçümleri farklı cihaz ve analist olmak üzere ikinci kez analiz edilmemiştir.

3.2.3.4.9. Laboratuvar Sapma (bias) Kontrolü

Laboratuvar sapması, çok miktarda ölçüm sonucundan elde edilen ortalama ölçülen değer ve kabul edilen değer arasındaki farktır [77]. Tekrar üretilebilirlikte açıklandığı gibi ölçümler farklı analist ve cihazda 2 kez tekrarlanmamış olup tekrarlanabilirlik hesabında kullandığımız ölçüm sonuçlarından yararlanılarak hesaplanmıştır.

3.2.3.4.10. Ölçüm Belirsizliği

Tüm ölçümler belirli bir hatadan etkilenir. Ölçüm belirsizliği, ölçüm hatasının ne denli büyük olabileceği konusunda bilgi verdiğinden raporlanan sonucun önemli bir parçasını oluşturmaktadır [77]. Tekrar üretilebilirlikte açıklandığı gibi ölçümler farklı analist ve cihazda 2 kez tekrarlanmamış ve tekrarlanabilirlik hesabında kullanılan ölçüm sonuçlarından yararlanılarak hesaplanmıştır.

3.2.3.4.11. Stabilite Testi

Stabilite testi için matrisler hazırlanmış, homojenite testi gerçekleştirilmiş ve 5 ay süre ile +4°C' de depolanmıştır. Depolamanın sonunda homojenlik testinde(4.2.1.2.5) olduğu gibi doğruluk ve tekrarlanabilirlik değerlendirmeleri aynı plate düzeni kullanılarak RT-PCR denemeleri ile yapılmıştır. Burada %25 RSD_r değerin içinde olması durumunda homojenlik testi ile karşılaştırılmaları yapılmıştır.

3.2.4. Laboratuvarlar Arası Karşılaştırma Testi

Laboratuvarın yeterliliğinin kanıtlanması ve rutin faaliyetlerinin kalitesinin sürdürülmesinde yeterlilik deneyleri ve laboratuvarlar arası karşılaştırma etkinlikleri önemli araçlardır. Yeterlilik deneyleri ya da laboratuvarlar arası karşılaştırma ölçümleri laboratuvarların eğitimi ve risk yönetimi için kullanabilirler [39].

Bu çalışmada, katılımcı laboratuvarlardan GDO tespiti için üretilen Gıda ve Yem Ürünlerinde GDO Yeterlilik Test Kiti ve eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonuna (RT-PCR) dayanan kendi prosedürleri kullanılarak nitel ve nicel analizler gerçekleştirilmesi istenmiştir. Kasım-Aralık 2018 döneminde düzenlenen Gıda ve Yem Örnekleri için GDO Yeterlilik Testine katıan laboratuvar sayısı 10 (on)'dur. Bu yeterlilik testi kapsamında katılımcı

laboratuvarların her birine ayrı ayrı tanımlayıcı kod numarası verilmiş, laboratuvarlar kendi kod numaraları hakkında bilgilendirilmiştir. Ayrıca her katılımcıya yeterlilik test sağlayıcısı tarafından hazırlanan sonuç raporu gönderilmiştir. Raporda yer alan sonuçlar ilgili kod numarası ile katılımcı laboratuvar tarafından değerlendirilir ve başka laboratuvarlar ile karşılaştırabilir.

Gıda ve yem ürünlerinde GDO yeterlilik testi, TS EN ISO/IEC 17043 Standardı şartlarını karşılayacak şekilde ve Türk Akreditasyon Kurumu (TÜRKAK) P704 Yeterlilik Deneyleri ve Laboratuvarlar Arası Karşılaştırma Programları Prosedürü gerekliliklerine uygun olarak hazırlanmış ve düzenlenmiştir [3,90].

Bu kapsamda hazırlanan GDO yeterlilik test kiti 15 Kasım 2018'de katılımcı laboratuvarlara gönderilmiştir. Her katılımcıya, içerisinde HU-1, HU-2, HU-3 ve HU-4 kodlu örnekler için A ve B olmak üzere 8 farklı numune bulunan yeterlilik test kiti, istenen GDO analizlerini gerçekleştirmeleri için ulaştırılmıştır. Katılımcılara GD çeşidin 35S promotör (p35S), nopalin sentaz terminatör (tNOS) ve diğer genetik bileşenler için elde ettikleri analiz sonuçlarını da istenen sonuçları içeren rapor ile birlikte verme seçeneği tanınmıştır. Bu yeterlilik testinde z-skoru ve yeterlilik için standart sapma tüm katılımcı laboratuvarlar arasından yalnızca nicel analizi yapmış olan laboratuvarlar için hesaplanmıştır

3.2.4.1. Nitel Analizlerin Değerlendirmesi

Yeterlilik testi sağlayıcısı olarak yapılan analizler sonucu beklenen değeri sağlayan sonuç için "B" (Başarılı), beklenen değeri sağlamayan sonuç için "BD" (Başarılı Değil) ifadesi kullanılmıştır. Yeterlilik testi sağlayıcısı tarafından gerçekleştirilmeyen ancak katılımcı laboratuvarların sonuç bildirdiği analizler için laboratuvarlar arası uyumluluk (consensus) ve literatür bilgisi esas alınarak "U" (Uygun) ve "UD" (Uygun değil) ifadesi kullanılmıştır.

3.2.4.2. Nicel Analiz Sonuçları İstatistiki Değerlendirmesi

Katılımcılar tarafından gönderilen sonuçlara göre HU-1, HU-3 ve HU-4 için atanmış değer (assigned value) sağlamak üzere istatistiki analizler kullanılmıştır. Bu değer ayrıca yeterlilik testi için standart sapma (Standard deviation for proficiency test) ve z-skoru hesaplanmasında esas alınmıştır [5, 77,91, 92, 93].

Atanmış değer $\mathbf{x_a}$, katılımcı sonuçlarındaki uyumluluğa göre türetilir. Yapılan yeterlilik testinde atanmış değerler katılımcı laboratuvar sonuçlarının ortalaması alınarak hesaplanmıştır [93,94,95, 96].

Bu çalışmada σp değeri tek laboratuvar analizleri validasyon çalışmasında elde edilen verilerin dağılımına dayalı olarak belirlenmiştir. Yeterlilik testi için standart sapma değeri raporlanan sonuçların z-skoru hesaplanmasında kullanılmıştır [93, 94, 95, 96].

Katılımcıların z-skoru aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$z = \frac{(\log 10\ x - \log 10\ xa)}{\sigma p}$$

x= katılımcının rapor ettiği sonucu

xa= atanmış değer

σp = yeterlilik testi için standart sapma

3.2.4.3. Z-Skoru Değerlendirme

z-skoru değerlendirilmesi aşağıda belirtilen kriterlere göre yapılmıştır:

- ✓ |z| ≤ 2,0 analiz sonucu uygundur
- ✓ 2,0 < |z| < 3,0 analiz sonucu şüphelidir (uyarı sinyali)
- ✓ |z| ≥ 3,0 analiz sonucu kabul edilemez (eylem sinyali) [97]

4. BULGULAR

4.1. DNA Ekstraksiyonu

DNA, örneklerin hazırlanması bölümünde belirtildiği gibi hazırlanan yeterlilik test kiti matrislerinden ve ticari olarak elde edilen sertifikalı referans materyallerden ekstrakte edilmiştir. Aşağıda elde edilen veriler gösterilmiş ve tartışılmıştır (Tablo 4.1 – Tablo 4.6)**.**

4.1.1. DNA Konsantrasyonu ve Tekrarlanabilirlik

4.1.1.1. Yeterlilik Test Kiti Matrisleri

Yeterlilik test kiti matrislerinin DNA konsantrasyonu ve tekrarlanabilirlik sonuçları Tablo 4.1, 4.2, 4.3 4.4'de verilmiştir.

Tabloda "ND" saptanamadı, "HU-1A^{1}" ticari mısır unu kullanılarak hazırlanan matristen ekstrakte edilen DNA'yı, "HU-1A^{2}" başka marka bir ticari mısır unu kullanılarak hazırlanan matristen ekstrakte edilen DNA'yı, "HU-3A^{1}" matrisin depolanma aşamasında 1. alt örnekleminden ekstrakte edilen DNA'yı, "HU-3A^{2}" matrisin depolanma aşamasında 2. alt örnekleminden ekstrakte edilen DNA'yı, "HU-3A^{3}", matrisin depolanma aşamasında 3. alt örnekleminden ekstrakte edilen DNA'yı, "HU-3A^{4}" matrisin depolanma aşamasında 4. alt örnekleminden ekstrakte edilen DNA'yı ifade etmektedir.

"HU-4A^{1}" matrisin ısıl işlem görmesinden dolayı matris DNA'sının 3'lü havuzda toplanmasını (3'lü pool) ve "HU-4A^{2}" ise matris DNA'sının 2'li havuzda toplanmasını (2'li pool) ifade etmektedir.

4.1.1.2. Sertifikalı Referans Malzeme

Sertifikalı referans malzeme olarak "AOCS 0407-A" mısır unu, "AOCS 0906-A" soya unu, "AOCS 0607-A2" %100 MIR604 çeşidi ve "AOCS 0809-A" %100 MON87701 çeşitlerinden DNA ekstraksiyonu ve tekrarlanabilirlik sonuçları Tablo 4.5 ve 4.6'da verilmiştir.

Tablo 4.1. Yeterlilik test kiti matrislerinin DNA ekstraksiyon sonuçları

Örnek	Nükleik Asit(ng/µL)	A260 (Abs)	A280 (Abs)	260/280	260/230
HU-1A[1]	546,90	10,937	5,447	2,01	2,08
	548,60	10,972	5,419	2,02	2,17
	ND				
	ND				
	391,40	7,827	4,037	1,94	1,94
	423,40	8,468	4,267	1,98	2,12
	492,80	9,857	4,958	1,99	2,10
	441,90	8,838	4,438	1,99	2,05
HU-1A[2]	1490,00	29,799	14,885	2,00	2,19
	1049,00	20,98	10,448	2,01	2,32
	885,80	17,716	9,141	1,94	2,16
	894,90	17,897	9,180	1,95	2,14
	1290,00	25,800	12,635	2,04	2,29
	1327,10	26,541	12,974	2,05	2,30
	1694,90	33,899	16,407	2,07	2,30
	1271,60	25,432	12,356	2,06	2,15
HU-2A	807,60	16,151	8,581	1,88	1,37
	1197,40	23,948	12,602	1,90	1,59
	464,40	9,289	4,953	1,88	1,16
	510,00	10,200	5,475	1,86	1,10
	960,70	19,215	9,654	1,99	1,72
	751,20	15,025	8,208	1,83	1,11
	606,00	12,120	6,267	1,93	1,39
	766,50	15,330	8,005	1,92	1,49
	1586,50	31,730	15,716	2,02	1,73
	1180,80	23,617	11,845	1,99	1,65
	1145,60	22,911	11,946	1,92	1,28
	1087,80	21,756	11,309	1,92	1,40
	881,50	17,629	8,871	1,99	1,77
	644,40	12,888	6,440	2,00	1,77
	1238,60	24,771	12,880	1,92	1,27
	1169,90	23,397	11,849	1,97	1,51
HU-3A[1]	975,30	19,506	10,041	1,94	1,60
	1046,00	20,920	10,005	2,09	1,91
	908,90	18,178	9,049	2,01	1,89
	1544,00	30,880	14,94	2,07	2,06
	2120,90	42,419	20,429	2,08	2,08
HU-3A[2]	2042,20	40,844	19,618	2,08	2,01
	735,30	14,706	7,222	2,04	1,77
	963,20	19,264	9,73	1,98	1,68
	1160,00	23,199	11,352	2,04	1,87
	1522,80	30,456	14,756	2,06	2,01
	1250,10	25,002	12,528	2,00	1,61
	1538,30	30,767	15,059	2,04	1,86
HU-3A[3]	1232,90	24,658	12,721	1,94	1,54
	876,30	17,526	8,866	1,98	1,65
	846,90	16,937	8,563	1,98	1,67
HU-3A[4]	1340,80	26,816	13,721	1,95	1,41
	1260,70	25,214	12,701	1,99	1,69
	1303,40	26,068	12,95	2,01	1,78
	1668,10	33,362	16,493	2,02	1,61
	1648,20	32,964	15,802	2,09	1,94
HU-4A[1]	169,90	3,397	1,695	2,00	1,79
	263,60	5,272	2,597	2,03	1,76
HU-4A[2]	20,00	0,399	0,229	1,75	0,51
	165,10	3,302	1,626	2,03	1,49
	167,30	3,346	1,658	2,02	1,40
	228,60	4,572	2,198	2,08	1,71
	173,20	3,463	1,719	2,02	1,45
	118,70	2,374	1,207	1,97	1,26
	69,00	1,380	0,976	1,41	0,60
	100,80	2,017	0,994	2,03	1,20
	124,50	2,490	1,295	1,92	1,20
	213,40	4,268	2,104	2,03	1,57

Tablo 4.2. Yeterlilik test kiti matrislerinin varyasyon katsayısı sonuçları

ÖRNEK	KONSANTRASYON (ng/µL)	ORTALAMA KONSANTRASYON	STANDART SAPMA	VARYASYON KATSAYISI
HU-1A^{1}	546,90	474,166	65,797	13,876
	548,60			
	391,40			
	423,40			
	492,80			
	441,90			
HU-1A^{2}	1490,00	1237,913	283,225	22,879
	1049,00			
	885,80			
	894,90			
	1290,00			
	1327,10			
	1694,90			
	1271,60			
HU-2A	807,60	937,431	310,418	33,114
	1197,40			
	464,40			
	510,00			
	960,70			
	751,20			
	606,00			
	766,50			
	1586,50			
	1180,80			
	1145,60			
	1087,80			
	881,50			
	644,40			
	1238,60			
	1169,90			
HU-3A^{1}	975,30	1299,215	385,069	29,639
	1046,00			
	908,90			
	1544,00			
	2120,90			
HU-3A^{2}	2042,20			
	735,30			
	963,20			
	1160,00			
	1522,80			
	1250,10			
	1538,30			
HU-3A^{3}	1232,90			
	876,30			
	846,90			
HU-3A^{4}	1340,80			
	1260,70			
	1303,40			
	1668,10			
	1648,20			
HU-4A^{1}	169,90	216,75	66,255	30,567
	263,60			
HU-4A^{2}	165,10	161,45	45,142	27,96
	167,30			
	228,60			
	173,20			
	118,70			
	100,80			
	124,50			
	213,40			

Tablo 4.3. Yeterlilik test kiti matrislerinin kontrol grubu DNA ekstraksiyon sonuçları

Örnek	Nükleik Asit (ng/µL)	A260 (Abs)	A280 (Abs)	260/280	260/230
HU-1B	412,30	8,246	4,214	1,96	1,98
	474,60	9,492	4,818	1,97	2,03
	402,40	8,049	4,138	1,95	1,95
	403,10	8,061	4,107	1,96	2,02
HU-2B	1261,40	25,228	12,589	2,00	1,81
	1240,60	24,812	12,791	1,94	1,66
	992,80	19,855	9,923	2,00	1,95
	1049,20	20,983	10,629	1,97	1,89
HU-3B	1378,90	27,579	13,41	2,06	2,16
	1318,40	26,367	12,868	2,05	2,08
	1795,30	35,906	17,359	2,07	2,15
	1440,00	28,801	13,904	2,07	2,09
HU-4B[1]	210,30	4,268	2,104	2,03	1,57
	127,00	1,141	0,573	1,99	0,95
	67,00	1,339	0,673	1,99	1,01
	97,00	1,141	0,573	1,99	1,95
	173,20	3,463	1,719	2,02	1,45

Tablo 4.4. Yeterlilik test kiti matrislerinin kontrol grubu varyasyon katsayısı sonuçları

ÖRNEK	KONSANTRASYON (ng/µL)	ORTALAMA KONSANTRASYON	STANDART SAPMA	VARYASYON KATSAYISI
HU-1B	412,30	423,10	34,628	8,184
	474,60			
	402,40			
	403,10			
HU-2B	1261,40	1136,00	135,039	11,887
	1240,60			
	992,80			
	1049,20			
HU-3B	1378,90	1483,15	213,939	14,424
	1318,40			
	1795,30			
	1440,00			
HU-4B[1]	210,30	134,90	57,578	42,680
	127,00			
	67,00			
	97,00			
	173,20			

Tablo 4.1 ve Tablo 4.3' de DNA'nın kalitesinin bir göstergesi olan spektrofotometrik okuma ile konsantrasyonları ölçülmüştür. Kaliteli DNA'nın 260/280 nm'de absorbansının 1.8-2 arasında olması önerilir. DNA'nın absorbans değerlerinin düşüklüğü, ortamda protein, fenol gibi diğer kontaminantların varlığına işaret edebilmektedir. Bu maddeler 280 nm' de maksimum absorbans göstermelerinin bir sonucu olarak 260/280 nm'deki değerleri düşürebilmektedirler. Saf RNA 260/280 nm' de absorbansı yaklaşık 2 olmalıdır. Kullandığımız DNA ekstraksiyon test kitinde RNaz olmadığı için 260/280 nm'deki absorbans değerleri 1,8'e yakın olmak ile birlikte bu değerin üstünde gözlenmiştir. Nükleik asitlerin saflığının diğer bir önemli ölçütü ise 260/230 nm'de absorbanslarının ölçülmesidir. 260/230 nm'de beklenen absorbans değeri DNA kalitesi bakımından 2 ile 2.2 arasında olması önerilir. Absorbans değeri beklenen bu değerden düşük ise 230 nm'de absorbansı olan kontaminantların varlığından şüphe edilmektedir[98].

DNA konsantrasyonları ENGL'nin raporları ile karşılaştırıldığında kullandığımız kit bazında sonuçların karşılaştırılabilir nitelikte olduğu gözlenmiştir[99,100]. Yöntemimizde μL başına 50 ng DNA ekstrakte edilmesi zorunludur.

Tablo 4.2 ve Tablo 4.4'te verilmiş olan varyasyon katsayıları sonuçlarında, ekstrakte edilen mısır ve ilgili çeşidinin DNA varyasyon katsayısı ENGL'nin "Report on the validation of a DNA Extraction Method from Maize Seeds[99]" raporu ile karşılaştırıldığında tüm DNA ekstraksiyonlarında yöntemimizin istikrarlı ve karşılaştırılabilir sonuçlar verdiği gözlenmiştir. Ekstrakte edilen soya ve ilgili çeşidindeki varyasyon katsayısı "Report on the Validatiton of a DNA Extraction Method for Soybean Seeds[100]" ile karşılaştırıldığında sonuçların oldukça benzer olduğu gözlenmiştir.

Tablo 4.5. Sertifikalı referans malzeme DNA ekstraksiyon sonuçları

Örnek	Nükleik Asit (ng/µL)	A260 (Abs)	A280 (Abs)	260/280	260/230
0407-A (Mısır Unu)	983,50	19,669	9,507	2,07	2,24
	1351,30	27,026	12,829	2,11	2,23
	1089,60	21,792	10,762	2,02	2,26
	1371,90	27,437	13,424	2,04	2,23
	691,60	13,832	6,961	1,99	2,13
	959,50	19,189	9,898	1,94	2,09
	1458,20	29,164	14,186	2,06	2,27
	1207,60	24,152	11,902	2,03	2,29
AOCS 0906-A (Soya Unu)	722,20	15,443	7,547	2,05	1,97
	1399,80	27,997	13,595	2,06	1,88
	495,30	9,906	4,814	2,06	1,71
	2016,20	40,324	19,175	2,10	2,12
	1521,20	30,423	14,398	2,11	2,10
	1796,90	35,939	16,909	2,13	2,16
AOCS 0607-A2 (%100 MIR604)	737,10	14,741	7,595	1,94	2,21
	724,80	14,496	7,402	1,96	2,25
	1004,70	20,094	9,782	2,05	2,24
	1073,60	21,472	10,587	2,03	2,05
	1490,00	29,799	14,885	2,00	2,19
	1049,00	20,980	10,448	2,01	2,32
	885,80	17,716	9,141	1,94	2,16
	894,90	17,897	9,180	1,95	2,14
	1119,40	22,389	11,061	2,02	2,30
AOCS 0809-A2 (%100 MON87701)	1000,40	20,007	9,757	2,05	1,88
	1492,80	29,856	14,555	2,05	1,78
	582,80	11,655	5,656	2,06	1,72
	1629,80	32,597	15,618	2,09	2,12
	1586,50	31,730	15,716	2,02	1,73
	1180,80	23,617	11,845	1,99	1,65
	1145,60	22,911	11,946	1,92	1,28
	1087,80	21,756	11,309	1,92	1,40
	958,70	19,174	9,310	2,06	2,05

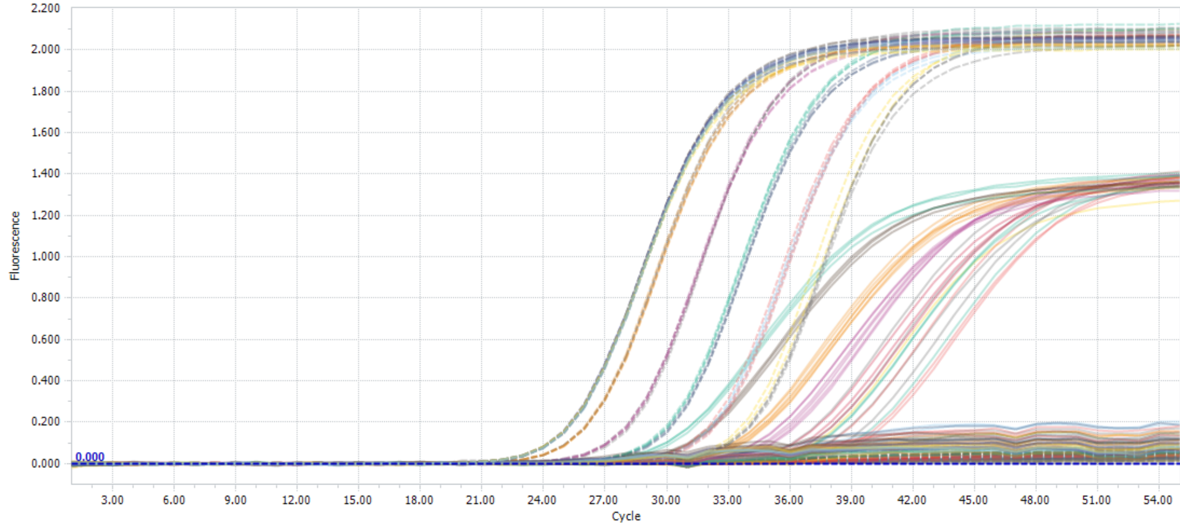
Tablo 4.5'deki veriler ekstrakte edilen DNA'nın saflığı ve miktarı hakkında yorum yapmamıza olanak vermektedir. Tablo 4.3' deki Türkiye içerisinden sağlanan ve GD içermediği bilinen soya ve mısır unları ile karşılaştırıldığında AOCS' den sağlanan GD içeren ve GD içermeyen unlardan ekstrakte edilen DNA'ların miktar ve kalite açısından veriminin daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu duruma DNA ekstraksiyonuna etki eden partikül çapı ve tanelerin öğütülme aşamasındaki parametrelerin etkili olduğu bilinmektedir. Varyasyon katsayıları literatür[99,100] ile karşılaştırıldığında istikrarlı sonuçlar alındığı gözlenmiştir.

Tablo 4.6. Sertifikalı referans malzeme varyasyon katsayısı sonuçları

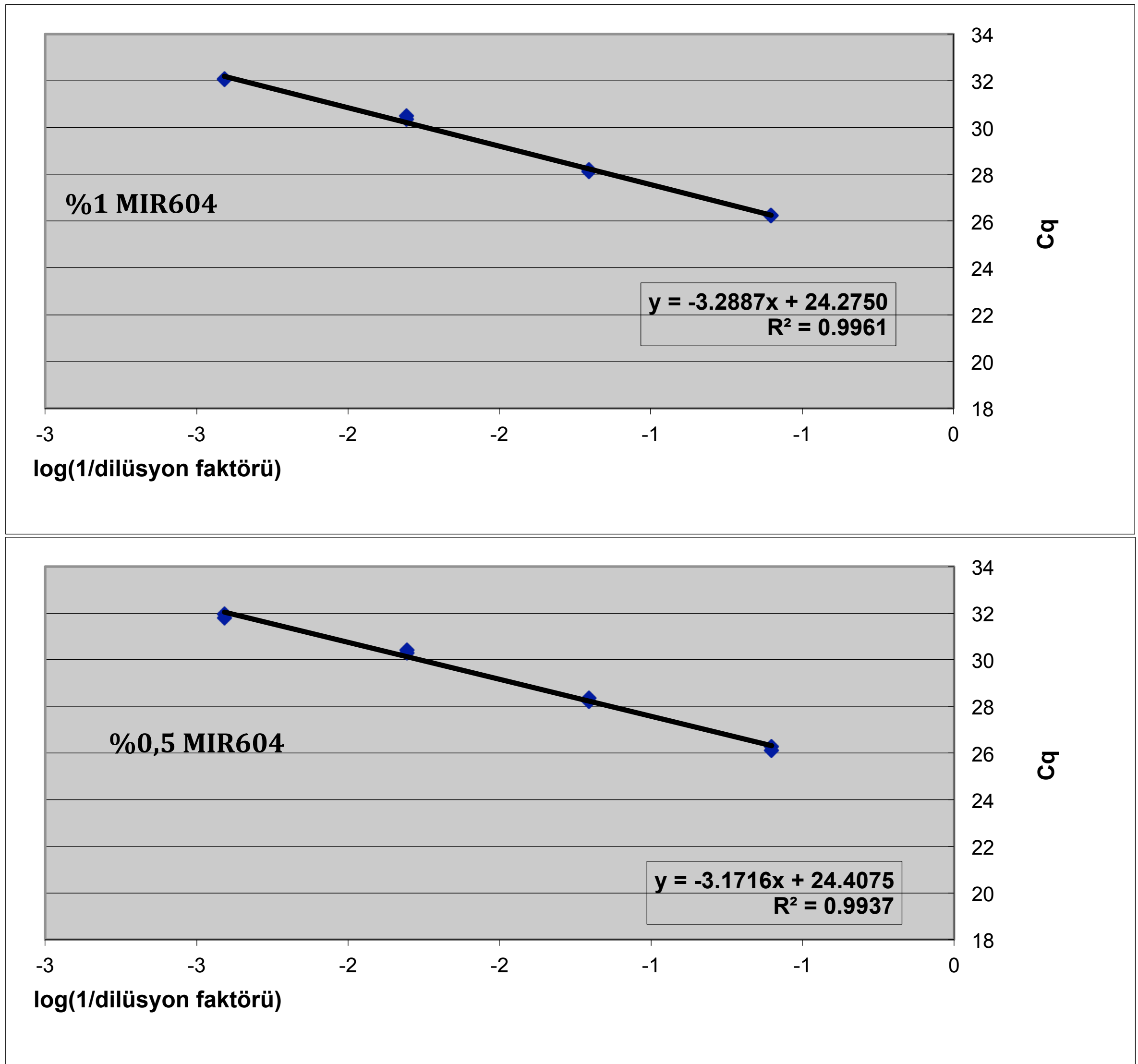
ÖRNEK	KONSANTRASYON (ng/µL)	ORTALAMA KONSANTRASYON	STANDART SAPMA	VARYASYON KATSAYISI
0407-A (Mısır Unu)	983,50	1139,150	257,714	22,623
	1351,30			
	1089,60			
	1371,90			
	691,60			
	959,50			
	1458,20			
	1207,60			
AOCS 0906-A (Soya Unu)	722,20	1325,267	599,384	45,227
	1399,80			
	495,30			
	2016,20			
	1521,20			
	1796,90			
AOCS 0607-A2 (%100 MIR604)	737,10	997,700	232,134	23,267
	724,80			
	1004,70			
	1073,60			
	1490,00			
	1049,00			
	885,80			
	894,90			
	1119,40			
AOCS 0809-A2 (%100 MON87701)	1000,40	1185,022	337,776	28,504
	1492,80			
	582,80			
	1629,80			
	1586,50			
	1180,80			
	1145,60			
	1087,80			
	958,70			

4.1.2. Safsızlık / PCR İnhibisyon Kontrolü

İnhibisyonu ölçmek için, dört adet 1:1, 1:4, 1:16, 1:64, 1:264 oranlarında seyreltilmiş numune, Ct değerleri ile seyreltmenin logaritmasına karşı çizilmiştir ve "seyreltilmemiş" numune için Ct değeridoğrusal regresyon ile hesaplanan denklemden tahmin edilmiştir. Daha sonra, "seyreltilmemiş" numune için tahmin edilen Ct, ölçülen Ct ile karşılaştırılmıştır. Değerlendirme, "seyreltilmemiş" numune için ölçülen Ct değeri, hesaplanan Ct değerinden 0.5 döngüden fazla ise PCR inhibitörlerinin mevcut olduğu dikkate alınarak gerçekleştirilir. Adh1 ve lec genlerine bakılarak PCR inhibisyon kontrolü için yapılan deneyin PCR sonuçları aşağıda gösterilmiştir (Şekil 4.1 - 4.4). Seyreltilmemiş ve seyreltilmiş örnekler için elde edilen Ct değerleri aşağıda rapor edilmiştir (Tablo 4.7-Tablo 4.10).



Şekil 4.1. %1 MIR604 ve %0,5 MIR604 mısır DNA'sı kullanılarak gerçekleştirilen inhibisyon testi FAM ve Yellow 555 kanallarındaki amplifikasyon eğrisi



Şekil 4.2. %1 MIR604 ve %0,5 MIR604 mısır DNA'sı kullanılarak gerçekleştirilen inhibisyon testi standart eğri görüntüsü

%1 MIR604 ve %0,5 MIR604 DNA'sı 1:1, 1:4, 1:16, 1:64, 1:264 olacak şekilde seri dilüsyonları hazırlandıktan sonra RT-PCR'da okutulmuştur. %1 MIR604 için oluşturulan kalibrasyon eğrisinin R^2 değeri 0,9961 ve eğimi -3,2887 olarak bulunmuştur ve bu değer -3,1 ile -3,6 arasında olduğu için güven aralığı içerisindedir. %0,5 MIR604 için ise R^2 değeri 0,9937 olarak ve eğimi -3,1716 olarak bulunmuş olup -3,1 ile -3,6 arasında olduğu için güven aralığı içerisindedir.

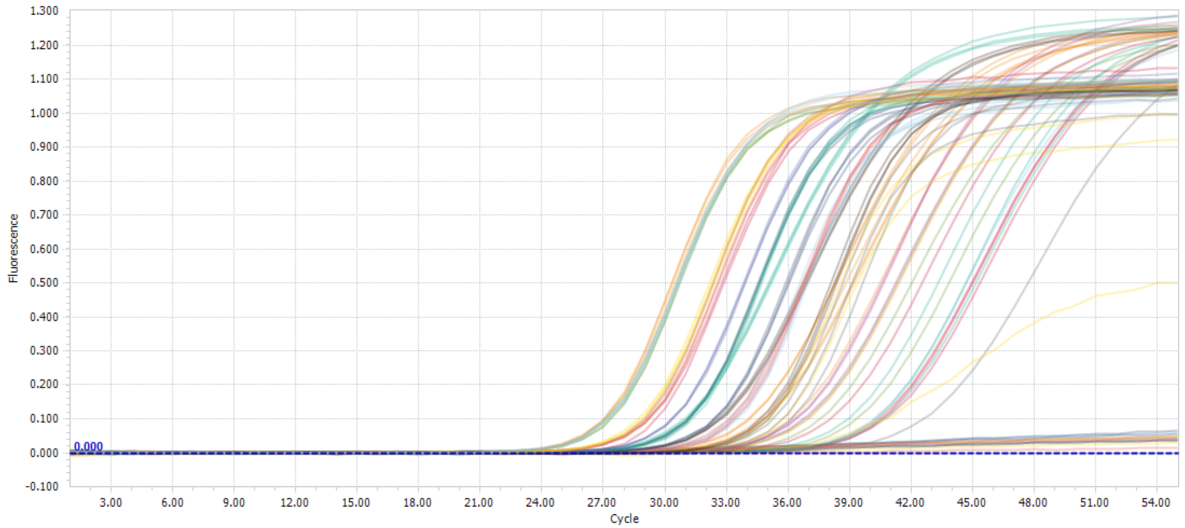
Tablo 4.7 ve Tablo 4.8' deki verilerde ortalama ΔCq değeri 4 noktada da beklenen ΔCq değerinden küçük olması (1,5-2,5 arasında) nedeni ile sonuçlarda inhibisyon gözlenmemiştir.

Tablo 4.7. Mısır alkol dehidrogenaz geninin (Adh1) amplifikasyonu sonrası %1 MIR604 örneğinin seyreltilmemiş ve dört kat seri olarak seyreltilmiş DNA ekstraktlarının Cq değerleri ve standart eğri

Örnek Adı:	**%1 MIR604**					
Dilüsyon Faktörü	**Ölçülen Cq**	**Cq Ortalama**	**ΔCq**	**Beklenen Cq Değeri**	**Logaritma**	
1 : 4	26,24 26,23	26,24	1,99	2	-0,6021	
1 : 16	28,12 28,19	28,16	1,92	2	-1,2041	
1 : 64	30,51 30,36	30,44	2,28	2	-1,8062	
1 : 256	32,09 32,06	32,08	1,64	2	-2,4082	
	Ölçülen Cq	**Cq Ortalama**	**Tahmin Edilen Cq**	**Tahmin Edilen - Ortalama Cq**		
Çalışma Dilüsyonu	24,20 24,29	24,25	24,28	0,03	**DOĞRU**	

Tablo 4.8. Mısır alkol dehidrogenaz geninin (Adh1) amplifikasyonu sonrası %0,5 MIR604 örneğinin seyreltilmemiş ve dört kat seri olarak seyreltilmiş DNA ekstraktlarının Cq değerleri ve standart eğri

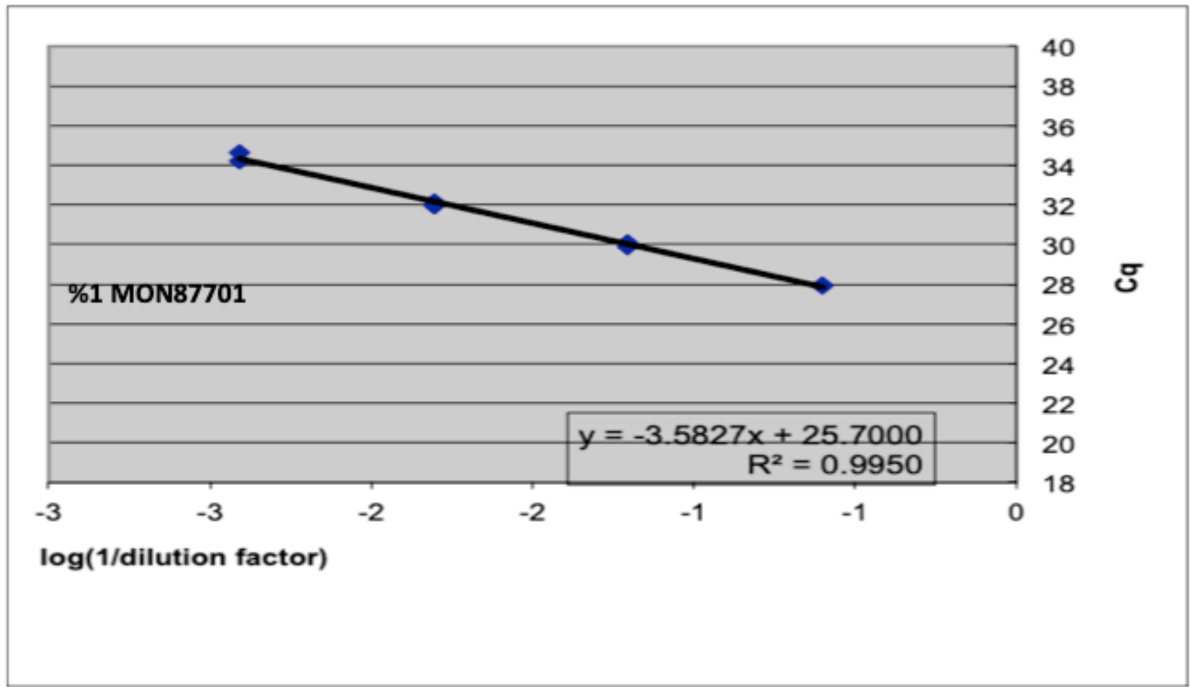
Örnek Adı:	**%0,1 MIR604**				
Dilüsyon Faktörü	**Ölçülen Cq**	**Cq Ortalama**	**ΔCq**	**Beklenen Cq Değeri**	**Logaritma**
1 : 4	26,28 26,12	26,20	1,96	2,00	-0,6021
1 : 16	28,23 28,35	28,29	2,09	2,00	-1,2041
1 : 64	30,31 30,41	30,36	2,07	2,00	-1,8062
1 : 256	31,95 31,80	31,88	1,52	2,00	-2,4082
	Ölçülen Cq	**Cq Ortalama**	**Tahmin Edilen Cq**	**Tahmin Edilen - Ortalama Cq**	
Çalışma Dilüsyonu	24,22 24,27	24,25	24,41	0,16	**DOĞRU**

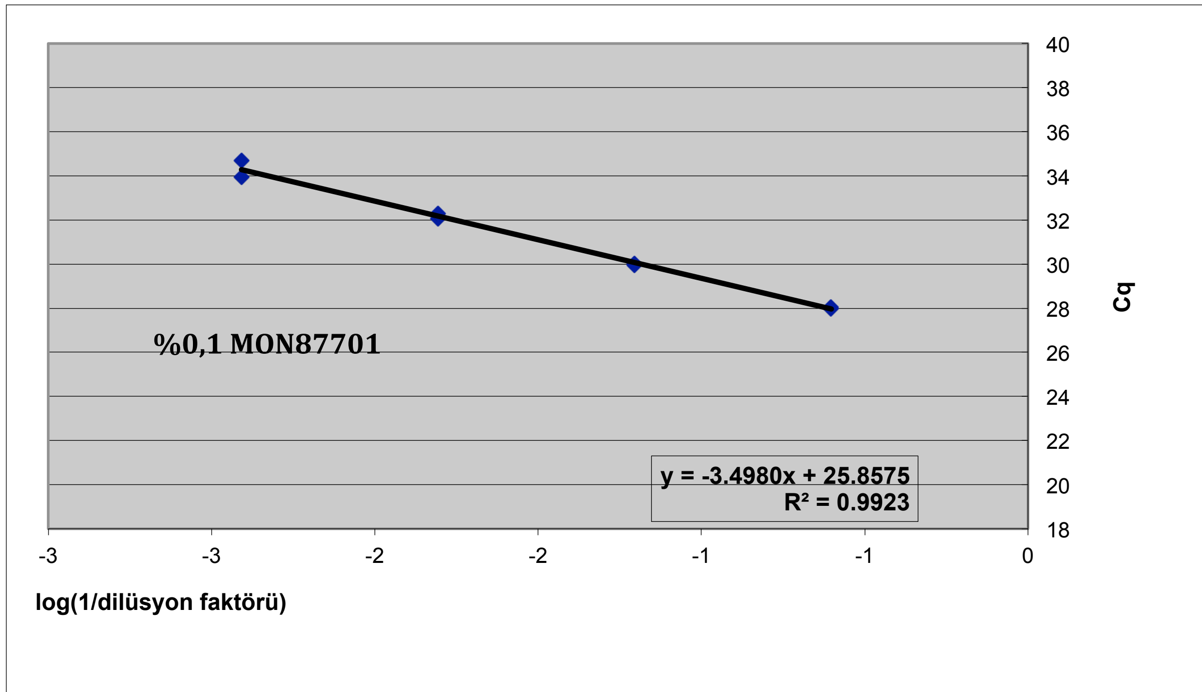


Şekil 4.3. %1 MON87701 ve %0,1 MON87701 soya DNA'sı kullanılarak gerçekleştirilen inhibisyon testi FAM kanalındaki amplifikasyon eğrisi

%1 MON87701 ve %0,1 MON87701 DNA'sı 1:1, 1:4, 1:16, 1:64, 1:264 olacak şekilde seri dilüsyonları hazırlandıktan sonra analize alınmıştır. %1 MON87701 için oluşturulan kalibrasyon eğrisinin R^2 değeri 0,9950 ve eğimi -3,5827 olarak bulunmuş olup -3,1 ile -3,6 arasında olduğu için güven aralığı içerisindedir. %0,1 MON87701 için ise R^2 değeri 0,9923 olarak ve eğimi -3,4980 olarak bulunmuş olup -3,1 ile -3,6 arasında olduğu için güven aralığı içerisindedir.

Tablo 4.9 ve Tablo 4.10' daki verilerde ortalama ΔCq değeri 4 noktada da beklenen ΔCq değerinden küçük olması(1,5-2,5 arasında) nedeni ile sonuçlarda inhibisyon gözlenmemiştir.





Şekil 4.4. %1 MON87701 ve %0,1 MON87701 soya DNA'sı kullanılarak gerçekleştirilen inhibisyon testi standart eğrileri

Tablo 4.9. Soya lektin geninin (lec) amplifikasyonu sonrası %1 MON87701 örneğinin seyreltilmemiş ve dört kat seri olarak seyreltilmiş DNA ekstraktlarının Cq değerleri ve standart eğri

Örnek Adı:	%1 MON87701				
Dilüsyon Faktörü	Ölçülen Cq	Cq Ortalama	ΔCq	Beklenen Cq Değeri	Logaritma
1 : 4	27,96 27,87	27,92	1,98	2,00	-0,6021
1 : 16	29,91 30,08	30,00	2,08	2,00	-1,2041
1 : 64	31,91 32,16	32,04	2,04	2,00	-1,8062
1 : 256	34,18 34,67	34,43	2,39	2,00	-2,4082
	Ölçülen Cq	Cq Ortalama	Tahmin Edilen Cq	Tahmin Edilen - Ortalama Cq	
Çalışma Dilüsyonu	25,91 25,96	25,94	25,7	0,23	DOĞRU

Tablo 4.10. Soya lektin geninin (lec) amplifikasyonu sonrası %0,1 MON87701 örneğinin seyreltilmemiş ve dört kat seri olarak seyreltilmiş DNA ekstraktlarının Cq değerleri ve standart eğri

Örnek Adı:	%0,1 MON87701				
Dilüsyon Faktörü	Ölçülen Cq	Cq Ortalama	ΔCq	Beklenen Cq Değeri	Logaritma
1 : 4	28,04 28,00	28,02	1,74	2,00	-0,6021
1 : 16	30,01 29,97	29,99	1,97	2,00	-1,2041
1 : 64	32,05 32,28	32,17	2,18	2,00	-1,8062
1 : 256	33,93 34,70	34,32	2,15	2,00	-2,4082
	Ölçülen Cq	Cq Ortalama	Tahmin Edilen Cq	Tahmin Edilen - Ortalama Cq	
Çalışma Dilüsyonu	26,29 26,28	26,29	25,86	0,43	DOĞRU

4.2. Tek Laboratuvar GDO Analizi

4.2.1. Validasyon Sonuçlarının Özeti

4.2.1.1. Referans Materyal

4.2.1.1.1. Yanlış Pozitif Oranı

Sonuçlar tablolar eşliğinde verilmiştir (Tablo 4.11 - Tablo 4.14).

Tablo 4.11. Mısır kontrol grubunda yanlış pozitif oranı (Soya aranması) sonuçları

SOYA ARANMASI	**ANALİST**
ÇALIŞMA SAYISI	16
NEGATİF	16
POZİTİF	0
YANLIŞ POZİTİF ORANI %	**0**

Tablo 4.11'de mısır içeren örneklerde soya aranmıştır ve 8 farklı örnek 2 paralel çalışılmıştır. Çalışılan hiç bir örnekte soya saptanmamıştır.

Tablo 4.12. Mısır kontrol grubunda yanlış pozitif oranı (MIR604 aranması) sonuçları

MIR604 ARANMASI	**ANALİST**
ÇALIŞMA SAYISI	16
NEGATİF	16
POZİTİF	0
YANLIŞ POZİTİF ORANI %	**0**

Tablo 4.12'de GD içermeyen mısır matrisi kontrol grubunda yanlış pozitiflik olarak MIR604 aranmıştır. 8 farklı örnek 2 paralel çalışılmış olup örneklerde MIR604 çeşidi saptanmamıştır. Yanlış pozitif oranı %0'dır.

Tablo 4.13. Soya kontrol grubunda yanlış pozitif oranı (Mısır aranması) sonuçları

SOYA ARANMASI	**ANALİST**
ÇALIŞMA SAYISI	16
NEGATİF	16
POZİTİF	0
YANLIŞ POZİTİF ORANI %	**0**

Tablo 4.13'de soya içeren örneklerde mısır aranmıştır ve 8 farklı örnek 2 paralel çalışılmıştır. Çalışılan hiç bir örnekte soya saptanmamıştır. Yanlış pozitif oranı %0'dır.

Tablo 4.14. Soya kontrol grubunda yanlış pozitif oranı (MON87701 aranması) sonuçları

MON87701 ARANMASI	**ANALİST**
ÇALIŞMA SAYISI	16
NEGATİF	16
POZİTİF	0
YANLIŞ POZİTİF ORANI %	**0**

Tablo 4.14’de GD içermeyen soya matrisi kontrol grubunda yanlış pozitiflik olarak MON87701 aranmıştır. 8 farklı örnek 2 paralel çalışılmış olup örneklerde MON87701 çeşidi saptanmamıştır. Yanlış pozitif oranı %0’dır.

4.2.1.1.2. Yanlış Negatif Oranı

Sonuçlar Tablo 4.15 ve Tablo 4.16’da verilmiştir.

Tablo 4.15. Mısır ve ilgili çeşidini içeren matrislerde yanlış negatif oranı (mısır aranması ve MIR604 aranması) sonuçları

MISIR ve MIR604 ARANMASI	**ANALİST**
ÇALIŞMA SAYISI	16
NEGATİF	0
POZİTİF	16
YANLIŞ NEGATİF ORANI %	**0**

Tablo 4.15’de mısır ile ilgili çeşidini içeren 8 farklı örnek 2 paralel çalışılmış olup örneklerde mısır ve MIR604 çeşidi aranmıştır. Sonuçlar hepsinde pozitif olduğu için yanlış negatif oranı %0’dır.

Tablo 4.16. Soya ve ilgili çeşidini içeren matrislerde yanlış negatif oranı (soya aranması ve MON87701 aranması) sonuçları

SOYA ve MON87701 ARANMASI	**ANALİST**
ÇALIŞMA SAYISI	16
NEGATİF	0
POZİTİF	16
YANLIŞ NEGATİF ORANI %	**0**

Tablo 4.16’da soya ile ilgili çeşidini içeren 8 farklı örnek 2 paralel çalışılmış olup örneklerde soya ve MON87701 çeşidi aranmıştır. Sonuçlar hepsinde pozitif olduğu için yanlış negatif oranı %0’dır.

4.2.1.1.3. İnhibisyon Testi

4.1.2 Safsızlık/inhibisyon kontrolü kısmında verildiği gibi hiç bir sonuçta inhibisyon gözlenmemiştir.

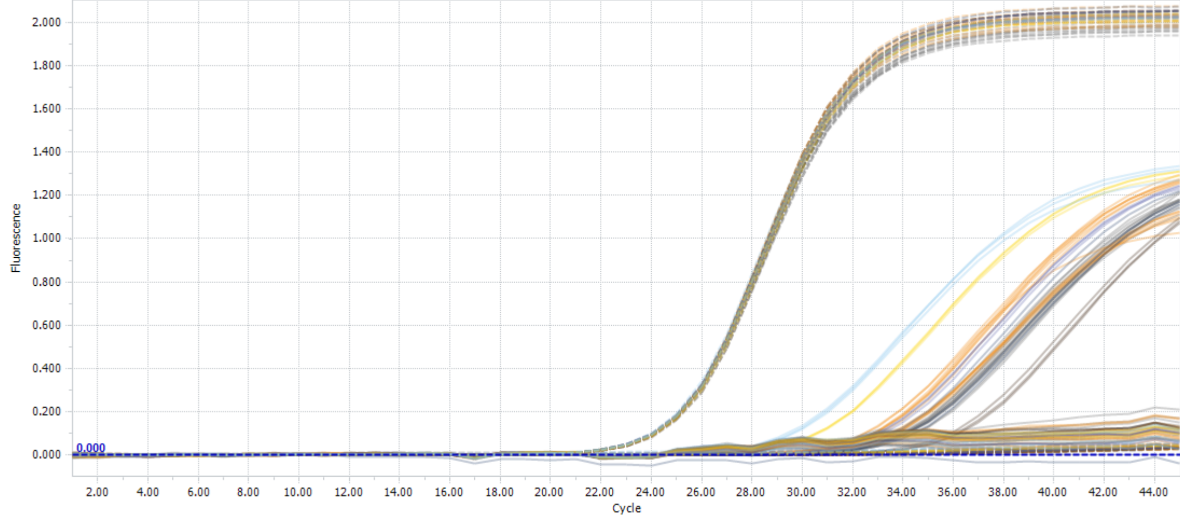
4.2.1.1.4. Minimum Tespit Sınırı (LOD)

MIR604 çeşidi için 20, 10, 8, 5 ve 1 kopya içeren karışımlar verilmiştir. 20, 10 ve 8 kopyanın tamamı pozitif sonuç verirken 5 ve 1 kopyaların tamamı pozitif sonuç vermemiştir. Bu durumda tüm tekrarların pozitif olduğu en düşük seviye (Practical LOD) 8 kopya olarak verilmektedir.

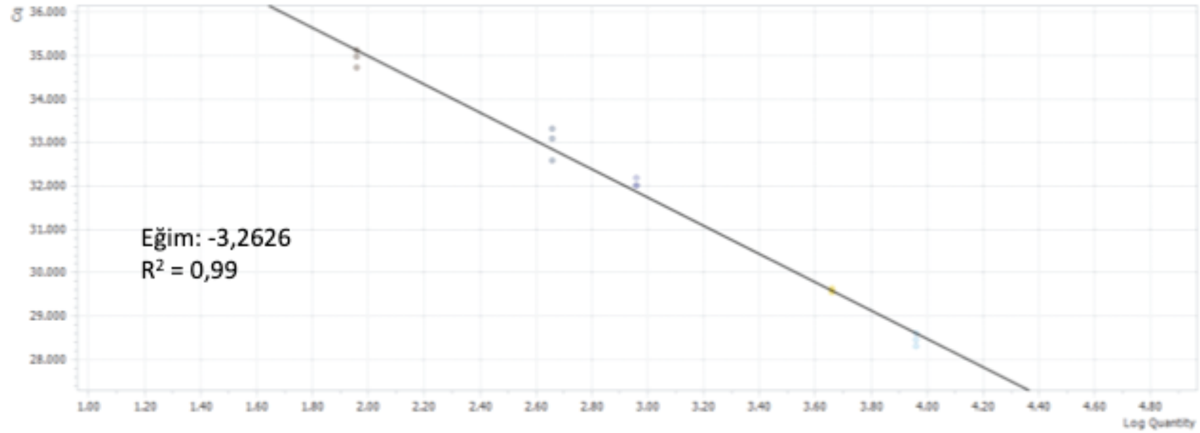
MON87701 çeşidi için 20, 10, 8, 5 ve 1 kopya içeren karışımlar verilmiştir. 20, 10 ve 8 kopyanın tamamı pozitif sonuç verirken 5 ve 1 kopyaların tamamı pozitif sonuç vermemiştir. Bu durumda tüm tekrarların pozitif olduğu en düşük seviye (Practical LOD) 8 kopya olarak verilmektedir.

4.2.1.1.5. Doğruluk

Doğruluk testi için yapılan PCR görüntüleri aşağıda şekiller eşliğinde verilmiştir(. Şekil 4.5 – Şekil 4.8). Görüntüler sonucundaki hesaplamalar tablolar ile verilmiştir Tablo 4.17 ve Tablo 4.18' de verilmiştir.

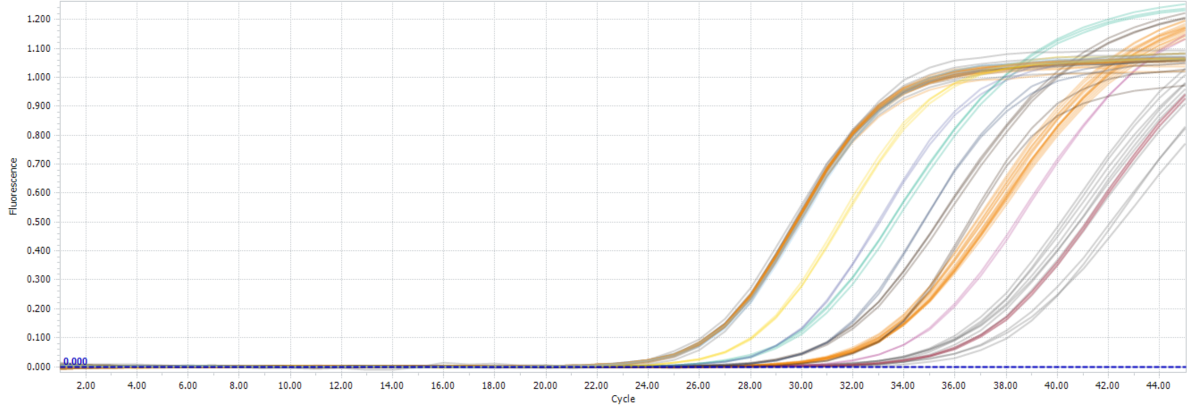


Şekil 4.5. %1 ve %0,5 MIR604 mısır DNA'sı kullanılarak gerçekleştirilen doğruluk testi için PCR'dan alınan amplifikasyon eğrisi görüntüsü

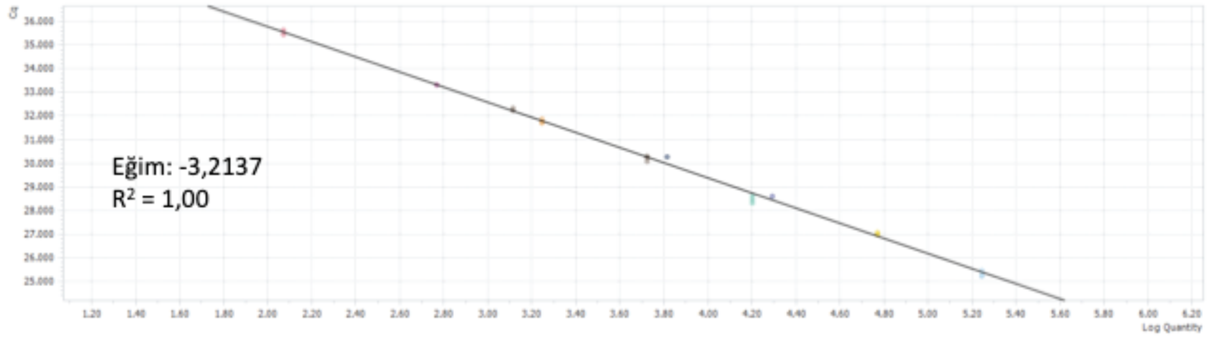


Şekil 4.6. %1 ve %0,5 MIR604 mısır DNA'sı kullanılarak gerçekleştirilen doğruluk testinin PCR'dan alınan standart eğri görüntüsü

Toplamda 5 noktadan 3 paralel çalışılarak standart eğri hazırlanmıştır. Oluşturulan kalibrasyon eğrisinin R^2 değeri 0,99 ve eğimi -3,2626 olarak bulunmuş olup -3,1 ile -3,6 arasında olduğu için güven aralığı içerisindedir.



Şekil 4.7. %1 ve %0,1 MON87701 soya DNA'sı kullanılarak gerçekleştirilen doğruluk testi için PCR'dan alınan amplifikasyon eğrisi görüntüsü



Şekil 4.8. %1 ve %0,1 MON87701 soya DNA'sı kullanılarak gerçekleştirilen doğruluk testinin PCR'dan alınan standart eğri görüntüsü

Toplamda 5 noktadan 3 paralel çalışılarak standart eğri hazırlanmıştır. Oluşturulan kalibrasyon eğrisinin R^2 değeri 1,00 ve eğimi -3,2137 olarak bulunmuş olup -3,1 ile -3,6 arasında olduğu için güven aralığı içerisindedir.

Tablo 4.17. Sertifikalı referans materyallerin doğruluk sonuçları

	DÜZEY	REPLİKELER	ORTALAMA	DOĞRULUK %	DÜZEY	REPLİKELER	ORTALAMA	DOĞRULUK %
MIR604	1%	1,050	1,09	**109,25**	1%	0,84	0,960	**96,00**
		1,180				0,76		
		1,040				1,04		
		1,100				1,2		
	1%	0,900	0,83	**83,00**	1%	0,9	0,940	**94,00**
		0,750				0,9		
		0,750				0,8		
		0,920				1,16		
	0,50%	0,560	0,52	**104,00**	0,50%	0,43	0,440	**89,00**
		0,600				0,44		
		0,480				0,47		
		0,440				0,44		
	0,50%	0,480	0,47	**93,50**	0,50%	0,52	0,510	**101,00**
		0,470				0,48		
		0,470				0,54		
		0,450				0,48		
MON87701	1%	0,960	0,88	**88,25**	1%	0,95	0,890	**89,25**
		0,860				0,93		
		0,890				0,85		
		0,970				0,84		
	1%	0,820	0,98	**98,00**	1%	0,92	0,900	**90,75**
		1,140				0,83		
		0,980				0,91		
		0,980				0,97		
	0,10%	0,072	0,083	**83,25**	0,10%	0,084	0,083	**83,75**
		0,108				0,093		
		0,074				0,076		
		0,079				0,082		
	0,10%	0,072	0,091	**91,00**	0,10%	0,084	0,082	**82,75**
		0,090				0,082		
		0,110				0,085		
		0,092				0,08		

Tablo 4.17'de verilen sertifikalı referans materyallerden hazırlanan %1 ve %0,5 düzeyindeki MIR604 ile %1 ve %0,1 düzeyindeki MON87701 çeşitleri için doğruluk değerleri %75 ve %125 arasında olduğu için kabul edilebilir doğruluk değer aralığında bulunmuştur.

4.2.1.1.6. Tekrarlanabilirlik

MIR604 ve MON87701 çeşidi için; %1 ve %0,5 içeren düzeylerin her biri için ayrı ayrı hesaplanmıştır.

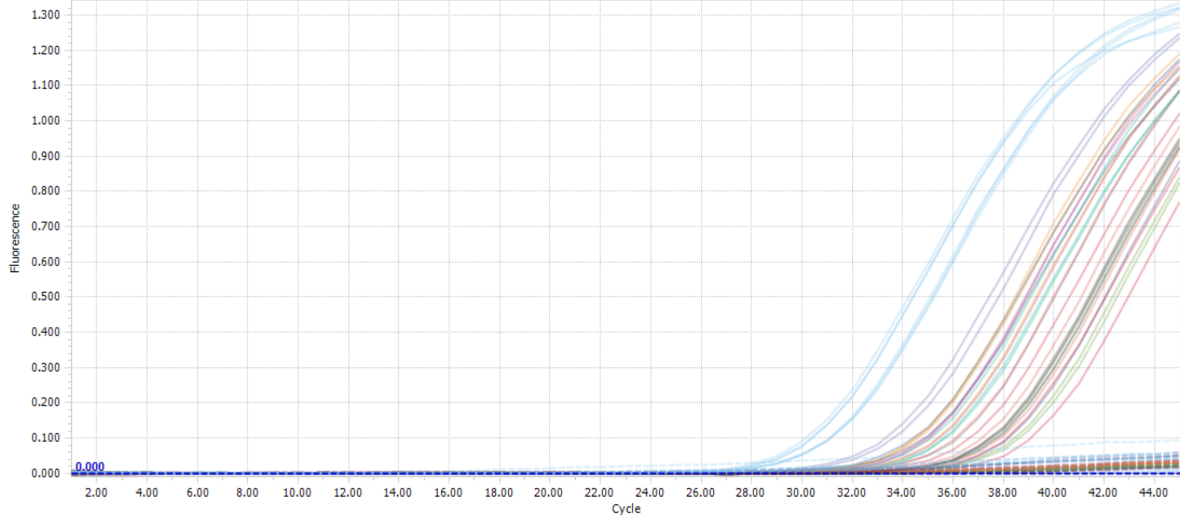
Yapılan analizler sonucu %RSD_r değeri kabul kriteri olan %25'den küçük olduğu için tekrarlanabilir sonuçlar elde edilmiştir(Tablo 4.18).

Tablo 4.18. Sertifikalı referans materyallerin tekrarlanabilirlik sonuçları

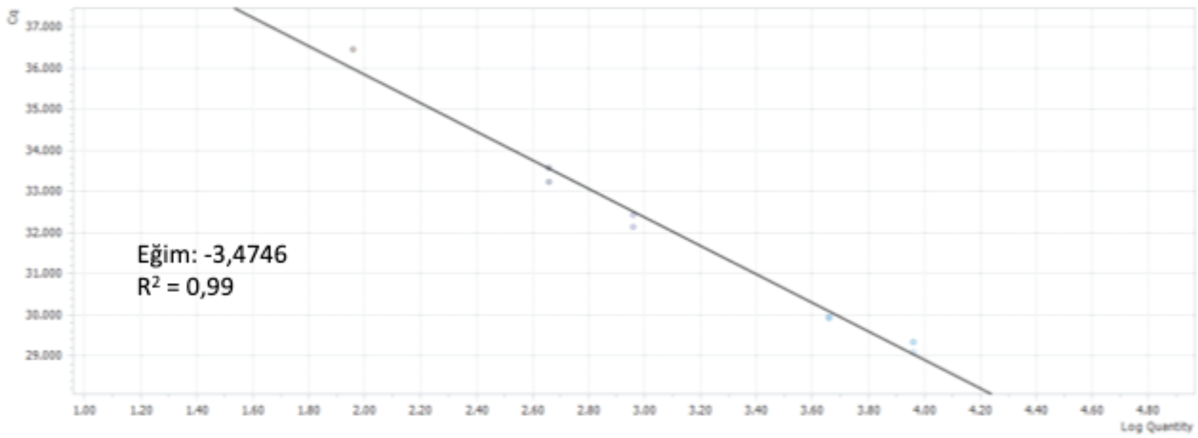
	ÖRNEK ADI:	ÖLÇÜLEN GD ORANI	Örneklerin ortalaması	Atanmış Değer	Standart Sapma	%RSDr
MIR604	1	1,05	1,093	1,00	0,063	14,41%
		1,18				
		1,04				
		1,10				
	2	0,90	0,830		0,092	
		0,75				
		0,75				
		0,92				
	3	0,84	0,960		0,198	
		0,76				
		1,00				
		1,20				
	4	0,90	0,940		0,154	
		0,90				
		0,80				
		1,16				
	1	0,56	0,520	0,50	0,073	8,44%
		0,60				
		0,48				
		0,44				
	2	0,48	0,468		0,012	
		0,47				
		0,47				
		0,45				
	3	0,43	0,445		0,017	
		0,44				
		0,47				
		0,44				
	4	0,52	0,505		0,030	
		0,48				
		0,54				
		0,48				
MON87701	1	0,96	0,880	1,00	0,053	10,02%
		0,86				
		0,89				
		0,97				
	2	0,82	0,980		0,155	
		1,14				
		0,98				
		0,81				
	3	0,95	0,890		0,055	
		0,93				
		0,85				
		0,84				
	4	0,92	0,900		0,057	
		0,83				
		0,91				
		0,97				
	1	0,07	0,083	0,10	0,016	14,10%
		0,11				
		0,07				
		0,08				
	2	0,07	0,091		0,015	
		0,09				
		0,11				
		0,09				
	3	0,08	0,083		0,007	
		0,09				
		0,08				
		0,08				
	4	0,08	0,082		0,002	
		0,08				
		0,09				
		0,08				

4.2.1.1.7. Minimum Ölçüm Sınırı (LOQ)

MIR604 ve MON87701 çeşitleri için absolut LOQ (LOQabs): 8 kopya bulunmuştur. İlgili GD çeşitleri için PCR görüntüleri aşağıda şekiller eşliğinde verilmiştir (Şekil 4.9. – Şekil 4.12).

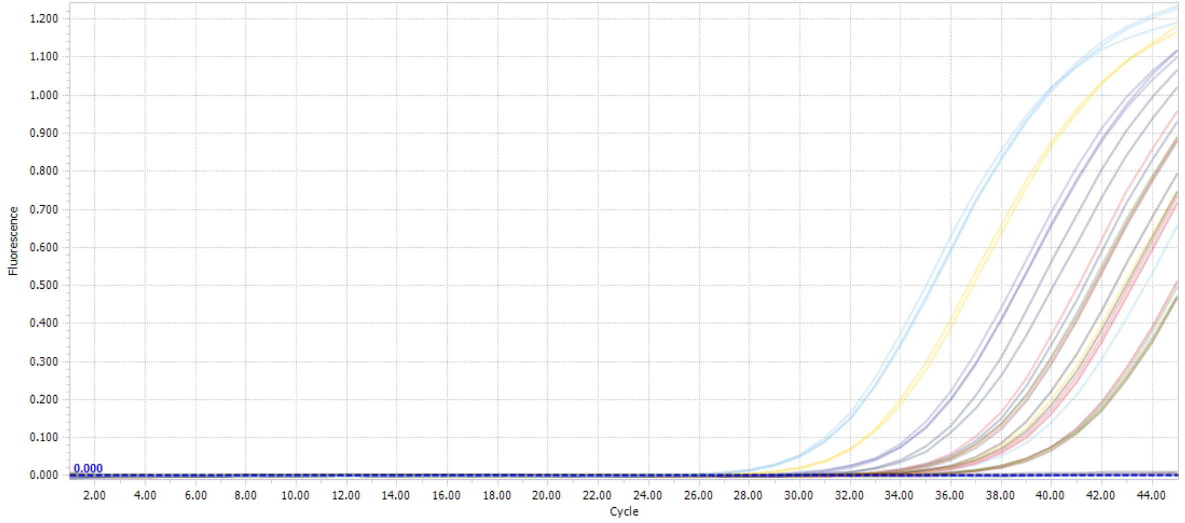


Şekil 4.9. MIR604 LOQ testinin PCR'dan alınmış amplifikasyon eğrisi görüntüsü

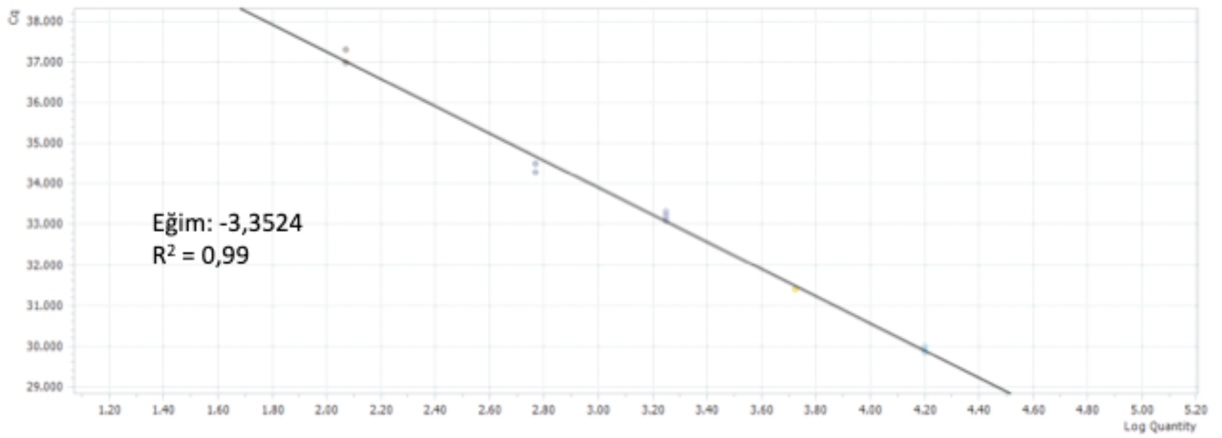


Şekil 4.10. MIR604 GD çeşidi için LOQ testinin standart eğri görüntüsü

Şekil 4.10'da MIR604 GD çeşidi için LOQ testinde standart eğrinin oluşturulmasında 5 farklı nokta 3 paralel olarak kullanılmış olup bu eğrinin R^2 değeri 0,99 ve eğim değeri -3,4746 olarak bulunmuş olup -3,1 ile -3,6 arasında olduğu için güven aralığı içerisindedir.



Şekil 4.11. MON87701 LOQ testinin PCR'dan alınmış amplifikasyon eğrisi görüntüsü



Şekil 4.12. MON87701 GD çeşidi için LOQ testinin standart eğri görüntüsü

Şekil 4.12'de MON87701 GD çeşidi için LOQ testinde standart eğrinin oluşturulmasında 5 farklı nokta 3 paralel olarak kullanılmış olup bu eğrinin R^2 değeri 0,99 ve eğim değeri -3,3524 olarak bulunmuş olup -3,1 ile -3,6 arasında olduğu için güven aralığı içerisindedir.

4.2.1.1.8. Tekrar Üretilebilirlik

Tekrar üretilebilirlik, test sonuçlarının, aynı metot uygulanarak, benzer test numuneleri ile farklı laboratuvarlarda, farklı kişi ve cihazlar ile elde edildiği koşullardır [77]. Çalışmamız da tek analist, tek cihaz olup; master miks, DNA ekstraksiyon test kiti, referans materyalin kısıtlı olmasından dolayı bu tanım ileriki ölçüm belirsizliği hesaplamak için modifiye edilmiştir. Doğruluk ve RSD_r hesabında kullanılan veriler kullanılarak hesaplanmış ve aynı örneklerin ikinci ölçümleri farklı cihaz ve analist olmak üzere ikinci kez analiz edilmemiştir.

MIR604 mısır çeşidi ve MON87701 soya çeşidi tekrar üretilebilirlik hesaplanması için tekrarlanabilirlikteki ölçüm sonuçları kullanılmış ve hesaplama sonuçları Tablo 4.19' da gösterilmiştir. Modifiye edilen istatistiki verilerce RSD_R değerleri %25' den küçük bulunduğu için tekrar üretilebilir sonuç alındığı yönünde değerlendirilmiştir.

4.2.1.1.9. Laboratuvar Sapma (bias) Kontrolü

Laboratuvar sapması, çok miktarda ölçüm sonucundan elde edilen ortalama ölçülen değer ve kabul edilen değer arasındaki farktır [77]. Ölçümler farklı analist ve cihazda 2 kez tekrarlanmamış olup MIR604 mısır çeşidi ve MON87701 soya çeşidi tekrar üretilebilirlik hesaplanması için tekrarlanabilirlikteki ölçüm sonuçları kullanılmıştır. Hesaplama sonuçları Tablo 4.20'de gösterildiği gibidir. Modifiye edilen istatistiki verilerce $\Delta m < U\Delta$ olduğu için laboratuvar sapma sonucu gözlenmemiştir(Tablo 4.20).

Tablo 4.19. Sertifikalı referans materyaller için tekrar üretilebilirlik hesaplaması

	Örnek numarası	ci_1	ci_2	Ortalama c_i	d_i (mutlak fark)	rad_i (nisbi fark)
	1	1,05	0,84	0,945	0,21	22,222
	2	1,18	0,76	0,970	0,42	43,299
	3	1,04	1,04	1,040	0,00	0,000
	4	1,10	1,20	1,150	0,10	8,696
	5	0,90	0,90	0,900	0,00	0,000
	6	0,75	0,90	0,825	0,15	18,182
	7	0,75	0,80	0,775	0,05	6,452
	8	0,92	1,16	1,040	0,24	23,077
	9	0,56	0,43	0,495	0,13	26,263
	10	0,60	0,44	0,520	0,16	30,769
	11	0,48	0,47	0,475	0,01	2,105
	12	0,44	0,44	0,440	0,00	0,000
	13	0,48	0,52	0,500	0,04	8,000
	14	0,47	0,48	0,475	0,01	2,105
	15	0,47	0,54	0,505	0,07	13,861
	16	0,45	0,48	0,465	0,03	6,452
	c_i			**0,720**		
	d_i			**0,101**		
	rad_i			**13,218**		
	S_R			**0,090**		
	RSD_R			**11,70%**		
	MIR604 için **RSD_R UYGUN**					
MON87701	Örnek numarası	ci_1	ci_2	Ortalama c_i	d_i (mutlak fark)	rad_i (nisbi fark)
	1	0,960	0,950	0,955	0,010	1,047
	2	0,860	0,930	0,895	0,070	7,821
	3	0,890	0,850	0,870	0,040	4,598
	4	0,970	0,840	0,905	0,130	14,365
	5	0,820	0,920	0,870	0,100	11,494
	6	1,140	0,830	0,985	0,310	31,472
	7	0,980	0,910	0,945	0,070	7,407
	8	0,980	0,970	0,975	0,010	1,026
	9	0,072	0,084	0,078	0,012	15,385
	10	0,108	0,093	0,101	0,015	14,925
	11	0,074	0,076	0,075	0,002	2,667
	12	0,079	0,082	0,081	0,003	3,727
	13	0,072	0,084	0,078	0,012	15,385
	14	0,090	0,082	0,086	0,008	9,302
	15	0,110	0,085	0,098	0,025	25,641
	16	0,092	0,080	0,086	0,012	13,953
	c_i			**0,505**		
	d_i			**0,052**		
	rad_i			**11,263**		
	S_R			**0,046**		
	RSD_R			**9,97%**		
	MON87701 için **RSD_R UYGUN**					

Tablo 4.20. Laboratuvar sapma kontrolü sonuçları

%0,5 MIR604		%1 MIR604		%0,1 MON87701		%1 MON87701	
Örnek numarası	**CRM ölçüm**	**Örnek numarası**	**CRM ölçüm**	**Örnek numarası**	**CRM ölçüm**	**Örnek numarası**	**CRM ölçüm**
1	0,56	1	1,05	1	0,072	1	0,96
2	0,60	2	1,18	2	0,108	2	0,86
3	0,48	3	1,04	3	0,074	3	0,89
4	0,44	4	1,10	4	0,079	4	0,97
5	0,48	5	0,90	5	0,072	5	0,82
6	0,47	6	0,75	6	0,09	6	1,14
7	0,47	7	0,75	7	0,110	7	0,98
8	0,45	8	0,92	8	0,092	8	0,98
9	0,43	9	0,84	9	0,084	9	0,95
10	0,44	10	0,76	10	0,093	10	0,93
11	0,47	11	1,04	11	0,076	11	0,85
12	0,44	12	1,20	12	0,082	12	0,84
13	0,52	13	0,90	13	0,084	13	0,92
14	0,48	14	0,90	14	0,082	14	0,83
15	0,54	15	0,80	15	0,085	15	0,91
16	0,48	16	1,16	16	0,08	16	0,97
ORTALAMA	**0,484**	ORTALAMA	**0,955**	ORTALAMA	**0,085**	ORTALAMA	**0,925**
S_r	**0,047**	S_r	**0,156**	S_r	**0,011**	S_r	**0,080**
c_m	**0,484**	c_m	**0,955**	c_m	**0,085**	c_m	**0,925**
c_{CRM}	**0,50**	c_{CRM}	**1,00**	c_{CRM}	**0,10**	c_{CRM}	**1,00**
Δ_m	**0,015**	Δ_m	**0,044**	Δ_m	**0,014**	Δ_m	**0,075**
u_{CRM}	**0,062**	u_{CRM}	**0,125**	u_{CRM}	**0,012**	u_{CRM}	**0,125**
u_M	**0,0119**	u_M	**0,039**	u_M	**0,002**	u_M	**0,020**
u_Δ	**0,063**	u_Δ	**0,13**	u_Δ	**0,012**	u_Δ	**0,126**
U_Δ	**0,127**	U_Δ	**0,261**	U_Δ	**0,025**	U_Δ	**0,253**
$\Delta_m<U_\Delta$	**SAPMA YOK**	$\Delta_m<U_\Delta$	**SAPMA YOK**	$\Delta_m<U_\Delta$	**SAPMA YOK**	$\Delta_m<U_\Delta$	**SAPMA YOK**

4.2.1.1.10. Ölçüm Belirsizliği

Ölçüm belirsizliği, ölçüm hatasının ne kadar büyük olabileceği hakkında bilgi verir ve bu nedenle raporlanan sonucun önemli bir parçasıdır [77]. Çalışmada farklı analist ve cihaz kullanılmamıştır. Tekrarlanabilirlik hesabında kullanılan ölçüm sonuçlarından yararlanılarak hesaplanmıştır.

MIR604 mısır çeşidi ve MON87701 soya çeşidi için ölçüm belirsizliği hesabı Tablo 4.21'de gösterildiği gibidir.

Tablo 4.21. Sertifikalı referans materyaller kullanılarak ölçüm belirsizliği hesabı

%1 MIR604	**RSD_R**	11,697	%1 MON87701	**RSD_R**	9,970
	n	16		**n**	16
	u_{CRM}	0,125		**u_{CRM}**	0,125
	c_{CRM}	1,00		**c_{CRM}**	1,00
	c	0,955		**c**	0,925
	u_{bias}%	12,830		**u_{bias}%**	12,746
	RSU%	17,360		**RSU%**	16,182
	u	0,165		**u**	0,149
	U	0,331		**U**	0,299
	0,955 ± 0,165 ölçüm belirsizliği saptanmıştır			0,925 ± 0,149 ölçüm belirsizliği saptanmıştır	
%0,5 MIR604	**RSD_R**	11,697	%0,1 MON87701	**RSD_R**	9,970
	n	16		**n**	16
	u_{CRM}	0,062		**u_{CRM}**	0,012
	c_{CRM}	0,50		**c_{CRM}**	0,10
	c	0,484		**c**	0,085
	u_{bias}%	12,830		**u_{bias}%**	12,746
	RSU%	17,360		**RSU%**	16,182
	u	0,084		**u**	0,016
	U	0,168		**U**	0,032
	0,484 ± 0,084 ölçüm belirsizliği saptanmıştır			0,085 ± 0,016 ölçüm belirsizliği saptanmıştır	

%1 MIR604 ile yapılan hesaplamalar sonucu 0,955 ± 0,165, %0,5 MIR604 ile yapılan hesaplamalar sonucu 0,484 ± 0,084, %1 MON87701 ile yapılan ölçümlerde 0,925 ± 0,149, %0,1 MON87701 ile yapılan ölçümlerde ise 0,085 ± 0,016 ölçüm belirsizliği hesaplanmıştır(Tablo 4.21).

4.2.1.2. Yeterlilik Test Kiti

4.2.1.2.1. Yanlış Pozitif Oranı

Çalışmada elde edilen yanlış pozitif oranı hesaplama sonuçları Tablo 4.22, 4.23, 4.24 ve 4.25'de verilmiştir.

Tablo 4.22. HU-1A için yanlış pozitif oranı sonuçları

SOYA ARANMASI	ANALİST
ÇALIŞMA SAYISI	16
NEGATİF	16
POZİTİF	0
YANLIŞ POZİTİF ORANI %	**0**

Tablo 4.22'de mısır içeren yeterlilik test kiti matrislerinde soya aranmıştır ve 8 farklı örnek 2 paralel çalışılmıştır. Çalışılan hiç bir örnekte soya saptanmamış olup yanlış pozitif oranı %0'dır.

Tablo 4.23. HU-1B için yanlış pozitif oranı sonuçları

MIR604 ARANMASI	ANALİST
ÇALIŞMA SAYISI	16
NEGATİF	16
POZİTİF	0
YANLIŞ POZİTİF ORANI %	**0**

Tablo 4.23'de mısır içeren yeterlilik test kiti kontrol grubu matrislerinde MIR604 aranmıştır ve 8 farklı örnek 2 paralel çalışılmıştır. Çalışılan hiç bir örnekte MIR604 çeşidi saptanmamış olup yanlış pozitif oranı %0'dır.

Tablo 4.24. HU-2A için yanlış pozitif oranı sonuçları

MISIR ARANMASI	ANALİST
ÇALIŞMA SAYISI	16
NEGATİF	16
POZİTİF	0
YANLIŞ POZİTİF ORANI %	**0**

Tablo 4.24'de soya içeren yeterlilik test kiti matrislerinde mısır aranmıştır ve 8 farklı örnek 2 paralel çalışılmıştır. Çalışılan hiç bir örnekte mısır saptanmamış olup yanlış pozitif oranı %0'dır.

Tablo 4.25. HU-2B için yanlış pozitif oranı sonuçları

MON87701 ARANMASI	1.ANALİST
ÇALIŞMA SAYISI	16
NEGATİF	16
POZİTİF	0
YANLIŞ POZİTİF ORANI %	**0**

Tablo 4.25’de soya içeren yeterlilik test kiti matrislerinde MON87701 aranmıştır ve 8 farklı örnek 2 paralel çalışılmıştır. Çalışılan hiç bir örnekte MON87701 çeşidine saptanmamış olup yanlış pozitif oranı %0’dır.

4.2.1.2.2. Yanlış Negatif Oranı

Çalışmada elde edilen yanlış negatif oranı hesaplamaları Tablo 4.26 ve 4.27’de verilmiştir

Tablo 4.26. HU-1A, HU-3A ve HU-4A için yanlış negatif oranı sonuçları

MISIR ve MIR604 ARANMASI	1.ANALİST
ÇALIŞMA SAYISI	32
NEGATİF	0
POZİTİF	32
YANLIŞ NEGATİF ORANI %	**0**

Tablo 4.26’da mısır ile ilgili çeşidini içeren 8 farklı örnek 4 paralel çalışılmış olup örneklerde mısır ve MIR604 çeşidi aranmıştır. Sonuçlar hepsinde pozitif olduğu için yanlış negatif oranı %0’dır.

Tablo 4.27. HU-2A, HU-3A ve HU-4A için yanlış negatif oranı sonuçları

SOYA ve MON87701 ARANMASI	1.ANALİST
ÇALIŞMA SAYISI	32
NEGATİF	0
POZİTİF	32
YANLIŞ NEGATİF ORANI %	**0**

Tablo 4.27’de soya ile ilgili çeşidini içeren 8 farklı örnek 4 paralel çalışılmış olup örneklerde soya ve MON87701 çeşidi aranmıştır. Sonuçlar çalışma sayılarının tamamında pozitif olduğu için yanlış negatif oranı %0’dır.

4.2.1.2.3. İnhibisyon Testi

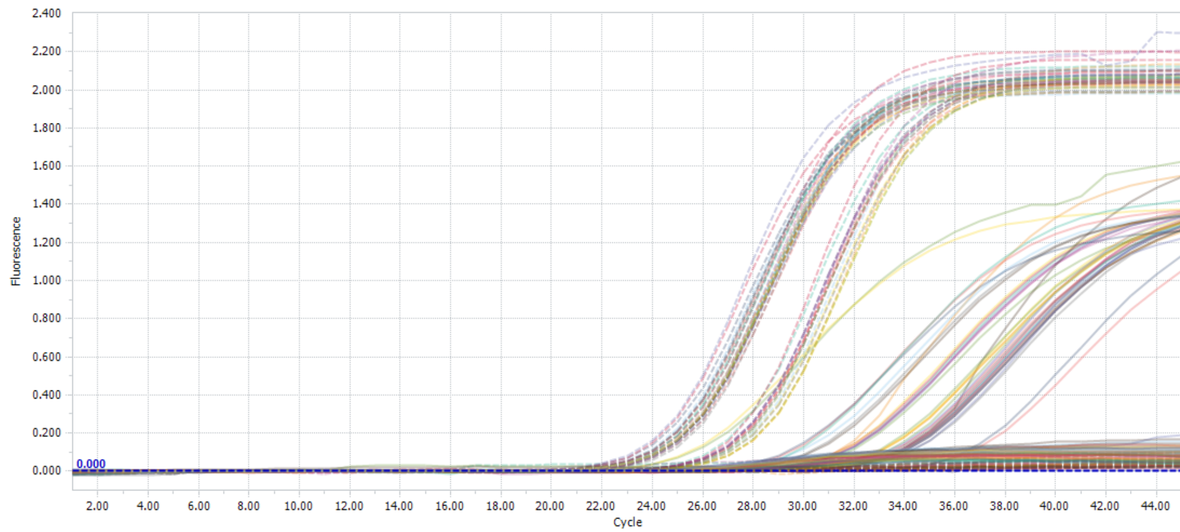
İnhibisyon testinde beklenen 1:1, 1:4, 1:16, 1:64, 1:256 oranlarındaki dilüsyonların beklenen değer ve ölçülen değer arasındaki fark 1,5 ve 2,5 aralığında olduğu için inhibisyon gözlenmemiştir.

4.2.1.2.4. Minimum Tespit Sınırı (LOD)

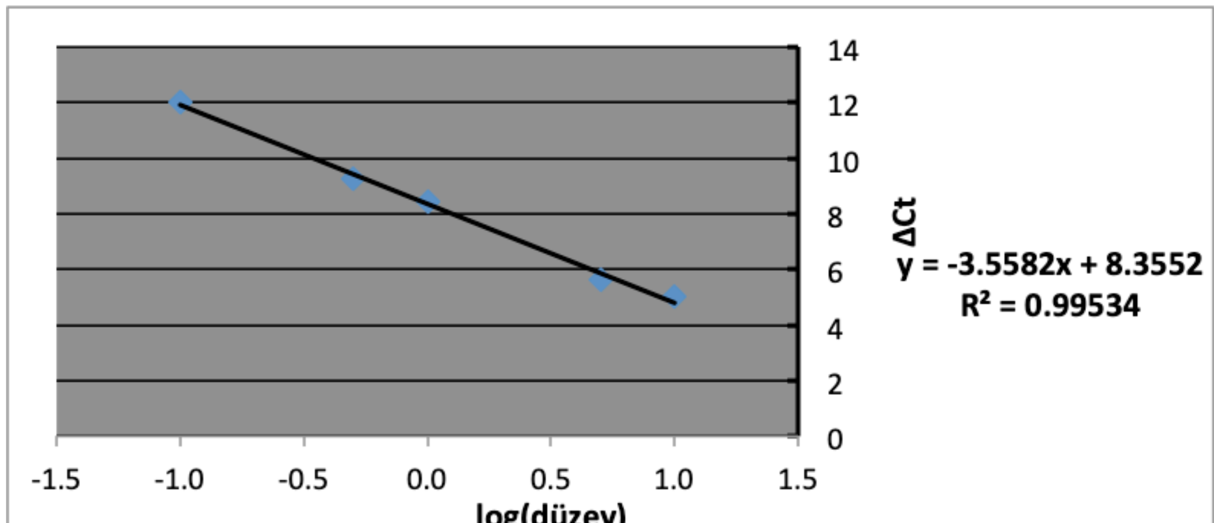
20, 10, 8, 5 ve 1 kopya içeren karışımlar hazırlanmıştır. HU-1A, HU-1B, HU-2A, HU-2B, HU-3A, HU-3B için 20 ve 10 ve 8 kopyanın tamamı pozitif sonuç verirken 5 ve 1 kopyaların tamamı pozitif sonuç vermemiştir. Bu durumda tüm tekrarların pozitif olduğu en düşük seviye (uygulamalı LOD) 8 kopya olarak verilmektedir. HU-4A ve HU-4B işlenmiş matrislerinde ise LOD değeri 10 olarak bulunmuştur.

4.2.1.2.5. Homojenlik Testi

Doğruluk ve tekrarlanabilirlik oluşturulan HU-1A, HU-2A, HU-3A matrisleri için ölçülmüştür. Verilen PCR amplifikasyon eğrilerinde HU-1A ve HU-3A için MIR604 çeşidi çalışıldığından aynı PCR amplifikasyon eğrisi altında verilmiş ve aynı şekilde HU-2A ve HU-3A için MON87701 çeşidi çalışıldığı için aynı PCR amplifikasyon eğrisi ile Şekil 4.13 – Şekil 4.16 arasında verilmiştir. HU-4A ısıl işlem gördüğünden dolayı yapılan deneyler sonucu istikrarlı bir nicel sonuç alınamamasından dolayı laboratuvarlararası karşılaştırma testi için kalitatif düzeyde MIR604 ve MON87701 çeşitlerinin pozitif değer verip vermediği ölçülmüştür. HU-4A ile ilgili PCR amplifikasyon eğrileri Şekil 4.17.- Şekil 4.20. arasında verilmiştir.

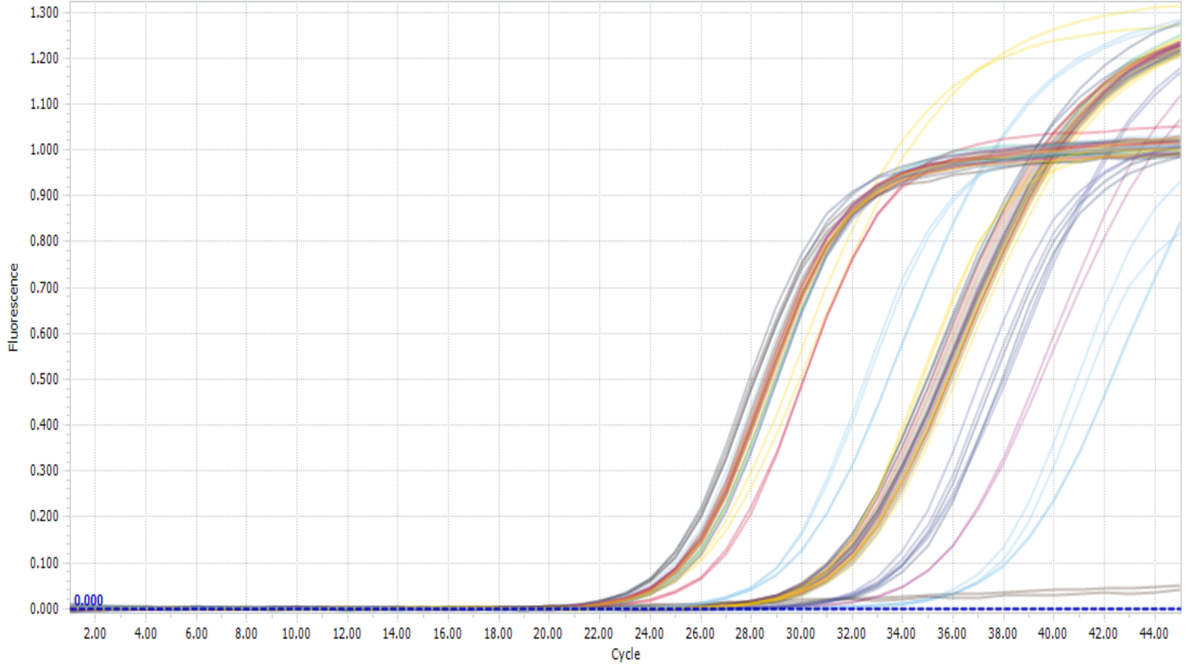


Şekil 4.13. HU-1A ve HU-3A MIR604 çeşidi için yapılan doğruluk değerlendirmesinde oluşan PCR amplifikasyon eğrisi görüntüsü

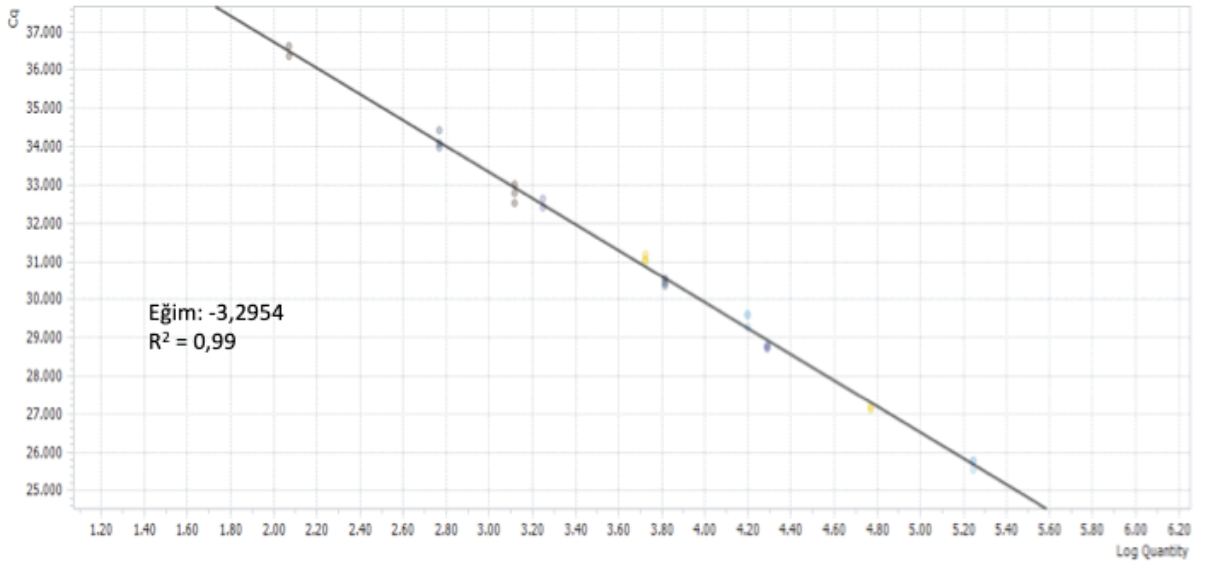


Şekil 4.14. HU-1A ve HU-3A MIR604 çeşidi için yapılan doğruluk değerlendirmesinde kullanılan standart eğri

HU-1A ve HU-3A matrisleri için oluşturulan kalibrasyon eğrisinin R^2 değeri 0,99534 ve eğimi -3,5582 olarak bulunmuş olup -3,1 ile -3,6 arasında olduğu için güven aralığı içerisindedir.

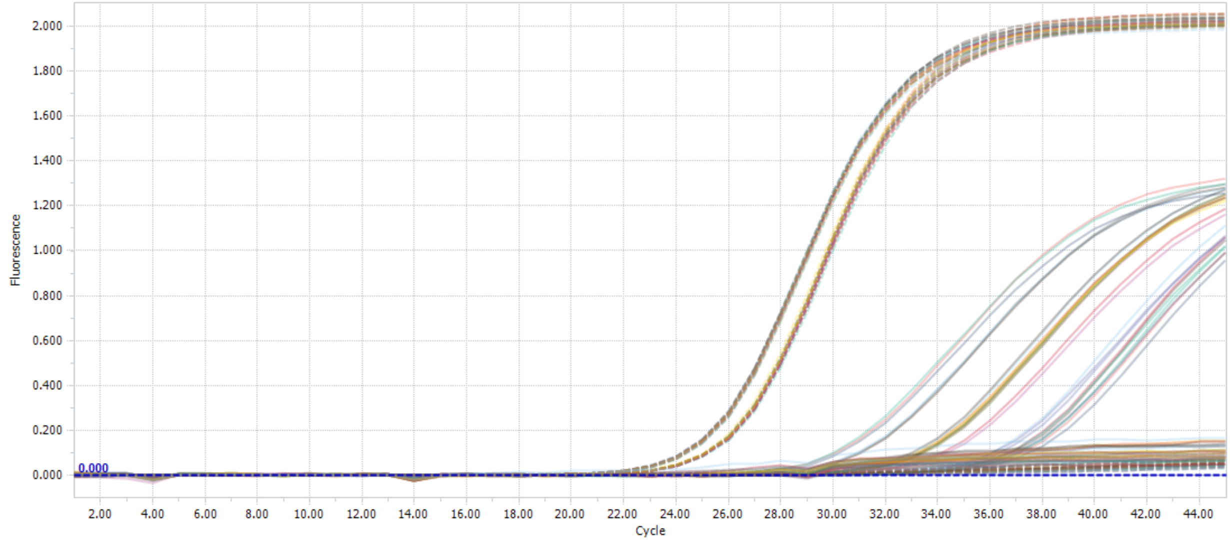


Şekil 4.15. HU-1A ve HU-3A MIR604 çeşidi için yapılan doğruluk değerlendirmesinde oluşan PCR amplifikasyon eğrisi görüntüsü

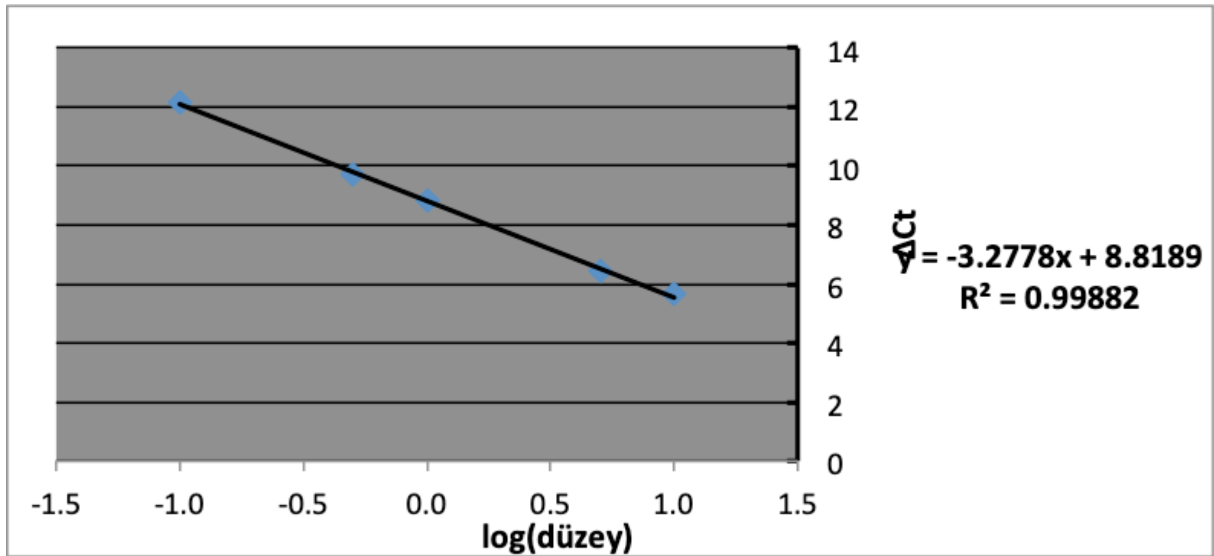


Şekil 4.16. HU-2A ve HU-3A MON87701 çeşidi için yapılan doğruluk değerlendirmesinde kullanılan standart eğri

HU-2A ve HU-3A matrisleri MON87701 çeşidi için oluşturulan kalibrasyon eğrisinin R^2 değeri 0,99 ve eğimi -3,2954 olarak bulunmuş olup -3,1 ile -3,6 arasında olduğu için güven aralığı içerisindedir.

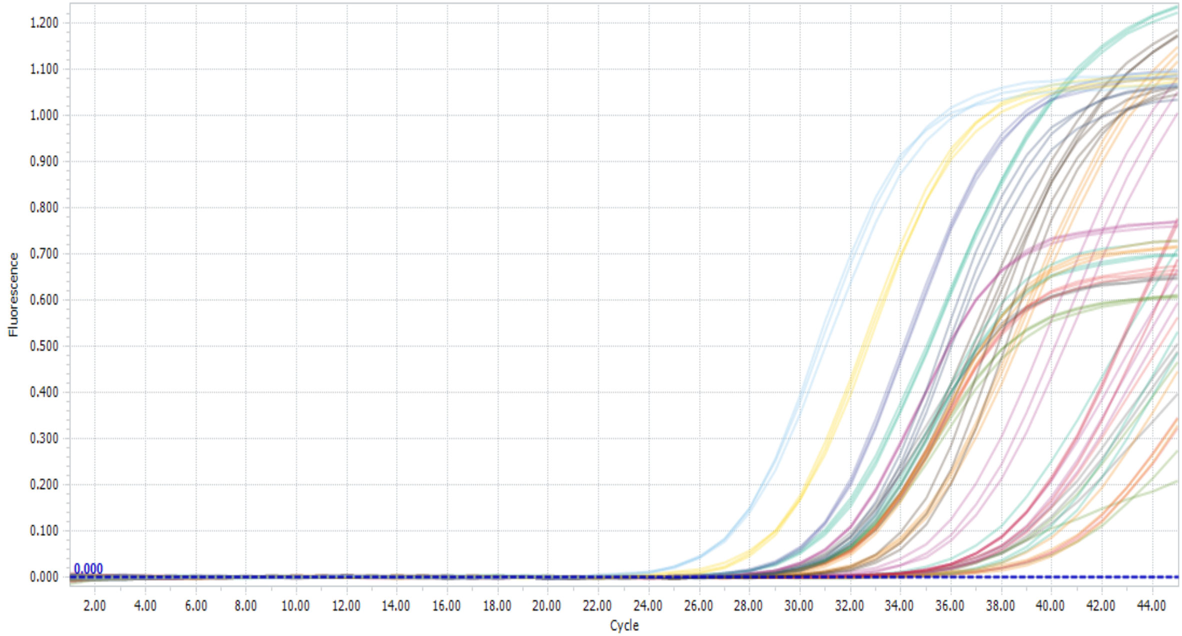


Şekil 4.17. HU-4A MIR604 hedef dizisi homojenlik değerlendirmesinde oluşan PCR amplifikasyon eğrisi görüntüsü

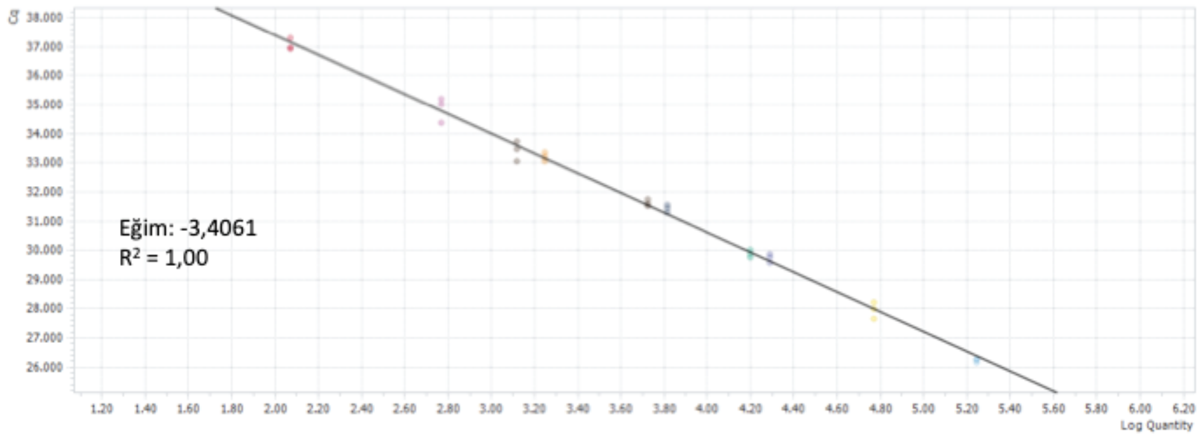


Şekil 4.18. HU-4A MIR604 hedef dizisi homojenlik değerlendirmesinde kullanılan standart eğri

HU-4A matrisinin MIR604 çeşidi için oluşturulan kalibrasyon eğrisinin R^2 değeri 0,99882 ve eğimi -3,2778 olarak bulunmuş olup -3,1 ile -3,6 arasında olduğu için güven aralığı içerisindedir.



Şekil 4.19. HU-4A MON87701 hedef dizisi homojenlik değerlendirmesinde oluşan PCR amplifikasyon eğrisi görüntüsü



Şekil 4.20. HU-4A MON87701 hedef dizisi homojenlik değerlendirmesinde kullanılan standart eğri

HU-4A matrisinin MON87701 çeşidi için oluşturulan kalibrasyon eğrisinin R^2 değeri 1,00 ve eğimi -3,4061 olarak bulunmuş olup -3,1 ile -3,6 arasında olduğu için güven aralığı içerisindedir.

4.2.1.2.5.1. Doğruluk

HU-1A, HU-2A, HU-3A ve HU-4A matrisleri için doğruluk sonuçları Tablo 4.28’de verilmiştir. Tablolarda gösterildiği üzere HU-1A ve HU-2A matrisi ilgili çeşitleri için %75-125 aralığında olup bundan sonraki analizler için uygun bulunmuştur. HU-3A MON87701 çeşidi için %75-125 aralığında olup sonraki analizler için uygundur. HU-3A MIR604 çeşidi ve HU-4A matrislerinin ilgili çeşitleri %25’lik aralığın dışında olduğu için bundan sonraki stabilite analizi için nitel analiz üzerinden değerlendirmeleri yapılmıştır.



Tablo 4.28. Matrislerin doğruluk sonuçları

	DÜZEY	REPLİKELER	ORTALAMA	DOĞRULUK %	DÜZEY	REPLİKELER	ORTALAMA	DOĞRULUK %
HU-1A MATRİSİ	1%	1,56	1,23	123,00	1%	0,98	1,15	115,25
		1,20				0,85		
		1,06				1,54		
		1,10				1,24		
	1%	1,46	1,01	100,75	1%	0,98	1,19	119,75
		0,96				1,25		
		0,69				1,52		
		0,92				1,04		
HU-2A MATRİSİ	2%	2,02	1,98	99,00	2%	2,15	2,15	107,50
		1,97				2,15		
		1,98				2,20		
		1,95				2,10		
	2%	2,10	2,16	108,00	2%	1,90	1,82	91,00
		2,19				1,78		
		2,19				1,82		
		2,16				1,78		
HU-3A MATRİSİ(MON87701)	2%	1,80	1,91	95,50	2%	2,30	1,98	99,00
		1,82				2,28		
		2,03				1,66		
		1,99				1,68		
	2%	1,93	1,81	90,50	2%	2,00	2,01	102,75
		1,83				1,94		
		1,75				2,10		
		1,73				2,18		
HU-3A MATRİSİ(MIR604)	2%	0,99	1,05	52,50	2%	0,44	0,67	33,88
		2,07				0,67		
		0,63				0,75		
		0,51				0,85		
	2%	1,08	0,83	41,88	2%	1,47	0,82	41,00
		0,62				0,78		
		1,12				0,73		
		0,53				0,30		
HU-4A MATRİSİ(MON87701)	2%	0,85	0,67	33,88	2%	3,31	1,91	95,63
		0,58				1,93		
		0,32				0,97		
		0,94				1,42		
	2%	1,47	1,05	52,61	2%	0,97	1,18	59,06
		1,04				1,31		
		0,75				1,57		
		0,93				0,86		
HU-4A MATRİSİ(MIR604)	2%	0,75	0,84	42,00	2%	0,93	0,82	41,38
		0,93				0,97		
		0,71				0,72		
		0,97				0,69		
	2%	0,27	0,20	10,13	2%	0,11	0,17	8,38
		0,23				0,13		
		0,18				0,15		
		0,13				0,28		

4.2.1.2.5.2. Tekrarlanabilirlik

HU-1A, HU-2A, HU-3A ve HU-4A matrisleri için tekrarlanabilirlik sonuçları tablolarda verildiği gibidir(Tablo 4.29 – Tablo 4.30).

Tablo 4.29. HU-1A ve HU-2A matrisinin tekrarlanabilirlik sonuçları

	ÖRNEK ADI:	**Ölçülen GDO Oranı**	**Örneklerin Ortalaması**	**Atanmış Değer**	**Standart Sapma**	**%RSDr**
HU-1A MATRİSİ	1	1,56	1,23	1	0,227	24,28%
		1,20				
		1,06				
		1,10				
	2	1,46	1,00		0,324	
		0,96				
		0,69				
		0,92				
	3	0,98	1,15		0,305	
		0,85				
		1,54				
		1,24				
	4	0,98	1,20		0,244	
		1,25				
		1,52				
		1,04				
HU-2A MATRİSİ	1	2,02	1,98	2	0,036	2,73%
		1,97				
		1,98				
		1,95				
	2	2,10	2,16		0,051	
		2,19				
		2,19				
		2,16				
	3	2,15	2,15		0,050	
		2,15				
		2,20				
		2,10				
	4	1,90	1,82		0,051	
		1,78				
		1,82				
		1,78				

Tablo 4.29’da HU-1A ve HU-2A matrisinin tekrarlanabilirlik sonuçları verilmiştir. Bu sonuçlarda %RSD$_r$ değeri %25’den küçük olduğu için oluşturulan matrislerin sonuçları tekrarlanabilirdir.

Tablo 4.30. HU-3A ve HU-4A matrisinin MON87701 ve MIR604 çeşitlerinin tekrarlanabilirlik sonuçları

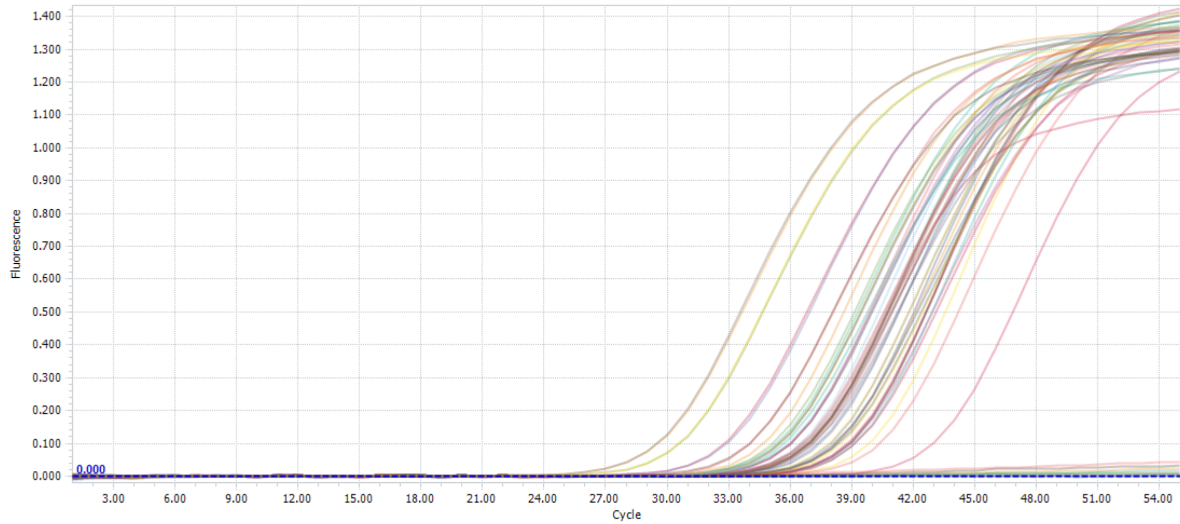
	ÖRNEK ADI:	Ölçülen GDO Oranı	Örneklerin Ortalaması	Atanmış Değer	Standart Sapma	%RSDr
HU-3A MATRİSİ(MON87701)	1	1,80	1,91	2,00	0,116	10,36%
		1,82				
		2,03				
		1,99				
	2	1,93	1,81		0,090	
		1,83				
		1,75				
		1,73				
	3	2,30	1,98		0,358	
		2,28				
		1,66				
		1,68				
	4	2,00	2,05		0,106	
		1,94				
		2,10				
		2,18				
HU-3A MATRİSİ(MIR604)	1	0,44	0,52	2,00	0,106	18,60%
		0,53				
		0,45				
		0,67				
	2	1,08	1,23		0,243	
		1,12				
		1,15				
		1,6				
	3	0,78	0,84		0,106	
		0,75				
		0,99				
		0,85				
	4	0,63	0,62		0,089	
		0,51				
		0,62				
		0,73				
HU-4A MATRİSİ(MON87701)	1	0,58	0,63	2,00	0,231	20,71%
		0,32				
		0,85				
		0,75				
	2	0,86	0,93		0,051	
		0,97				
		0,93				
		0,97				
	3	1,04	1,18		0,224	
		0,94				
		1,31				
		1,42				
	4	1,57	1,79		0,335	
		1,93				
		1,47				
		2,20				
HU-4A MATRİSİ(MIR604)	1	0,75	0,84	2,00	0,129	21,20%
		0,93				
		0,71				
		0,97				
	2	0,27	0,20		0,060	
		0,23				
		0,18				
		0,13				
	3	0,93	0,83		0,143	
		0,97				
		0,72				
		0,69				
	4	0,11	0,17		0,077	
		0,13				
		0,15				
		0,28				

Tablo 4.30’da HU-3A ve HU-4A matrisinin tekrarlanabilirlik sonuçları verilmiştir. Bu sonuçlarda %RSD_r değeri %25’den küçük olduğu için oluşturulan matrislerin sonuçları tekrarlanabilirdir.

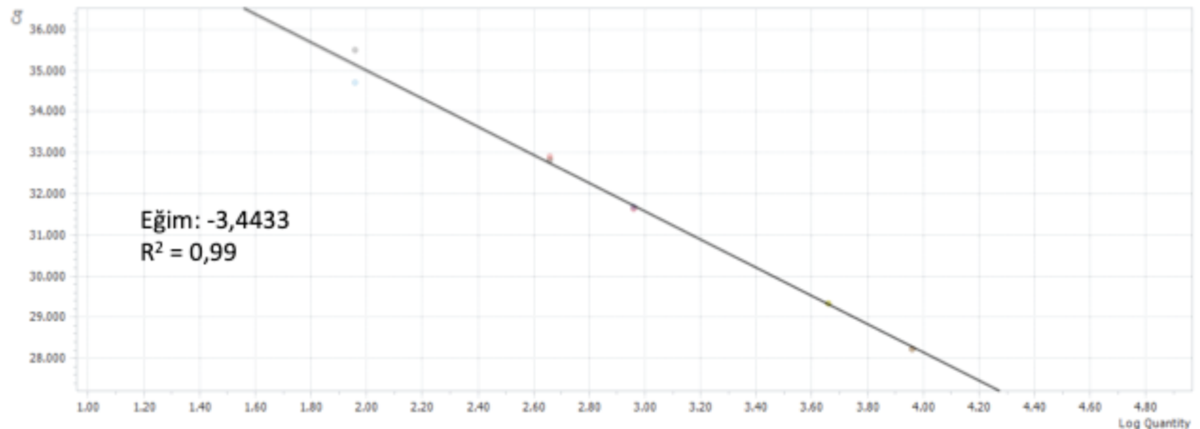
4.2.1.2.7. Minimum Ölçüm Sınırı (LOQ)

HU-1A ve HU-1B matrisi için uygulamalı değeri 8 kopya bulunmuştur. HU-2A ve HU-2B matrisi için uygulamalı LOQ değeri 8 kopya bulunmuştur. HU-3A ve HU-3B matrisi için (MON87701 ve MIR604 çeşidi dizisi) için uygulamalı LOQ 8 kopya bulunmuştur. HU-4A ve HU-4B matrisi için (MON87701 ve MIR604 çeşidi dizisi) uygulamalı LOQ 10 kopya bulunmuştur.

Sonuçların PCR amplifikasyon eğrisi görüntüleri Şekil 4.21. – Şekil 4.24. arasında verilmiştir.

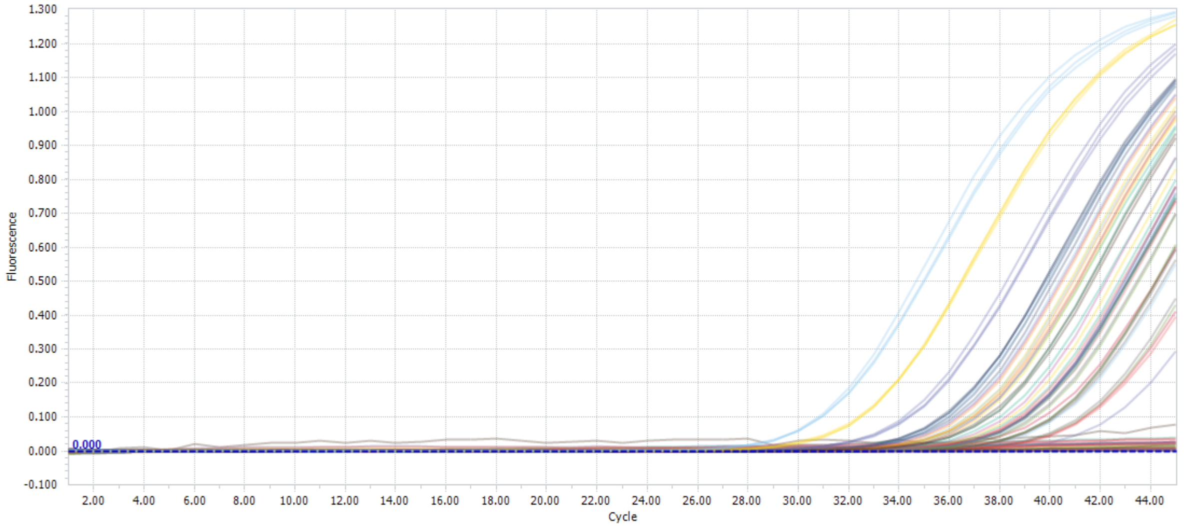


Şekil 4.21. HU-1A ve HU-3A LOQ testinin PCR’dan alınmış amplifikasyon eğrisi görüntüsü

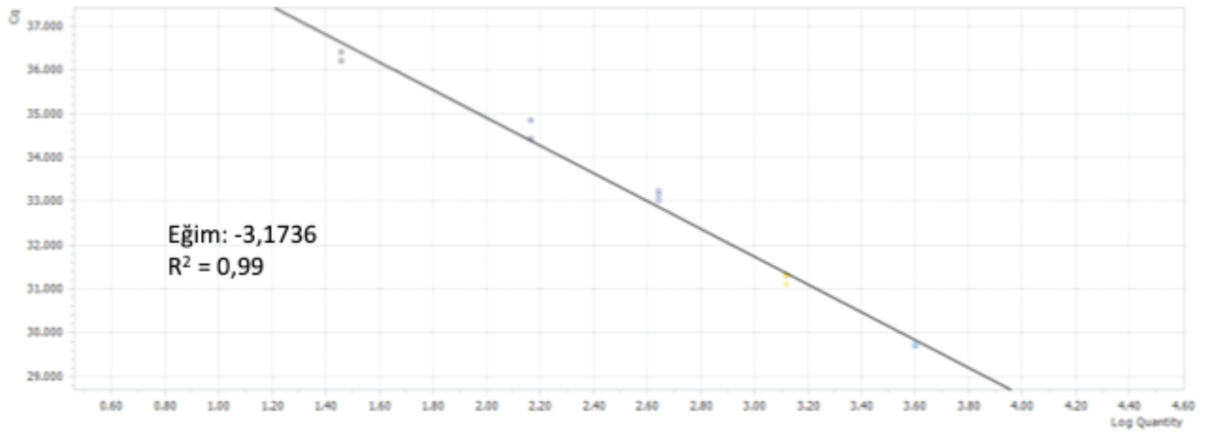


Şekil 4.22. HU-1A ve HU-3A için LOQ testinin standart eğri görüntüsü

HU-1A ve HU-3A matrisinin MIR604 çeşidi için oluşturulan kalibrasyon eğrisinin R^2 değeri 0,99 ve eğimi -3,4433 olarak bulunmuş olup -3,1 ile -3,6 arasında olduğu için güven aralığı içerisindedir.



Şekil 4.23. HU-2A, HU-3A ve HU-4A LOQ testinin PCR'dan alınmış amplifikasyon eğrisi görüntüsü

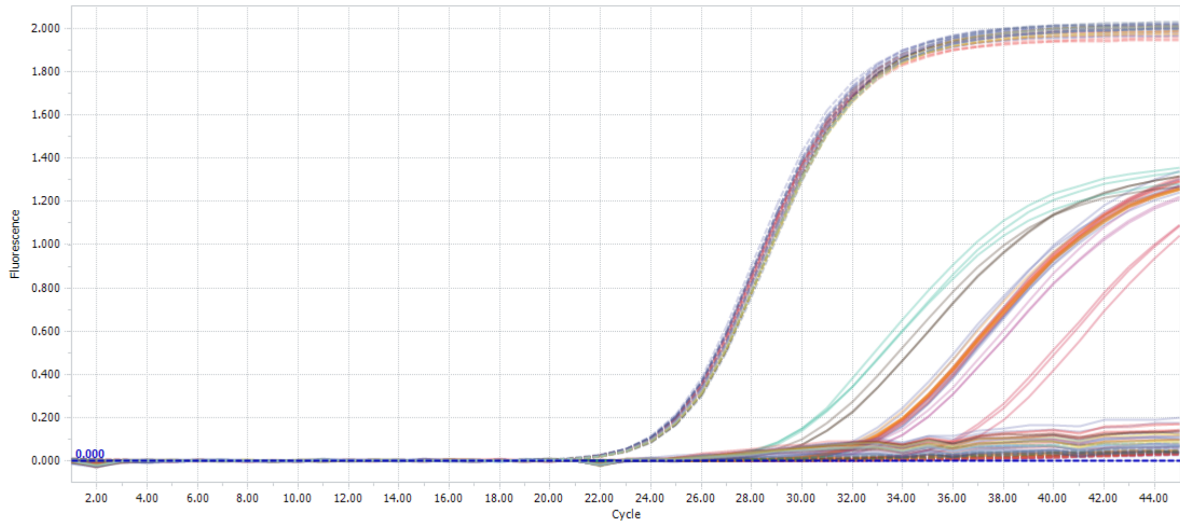


Şekil 4.24. HU-2A, HU-3A ve HU-4A için LOQ testinin standart eğri görüntüsü

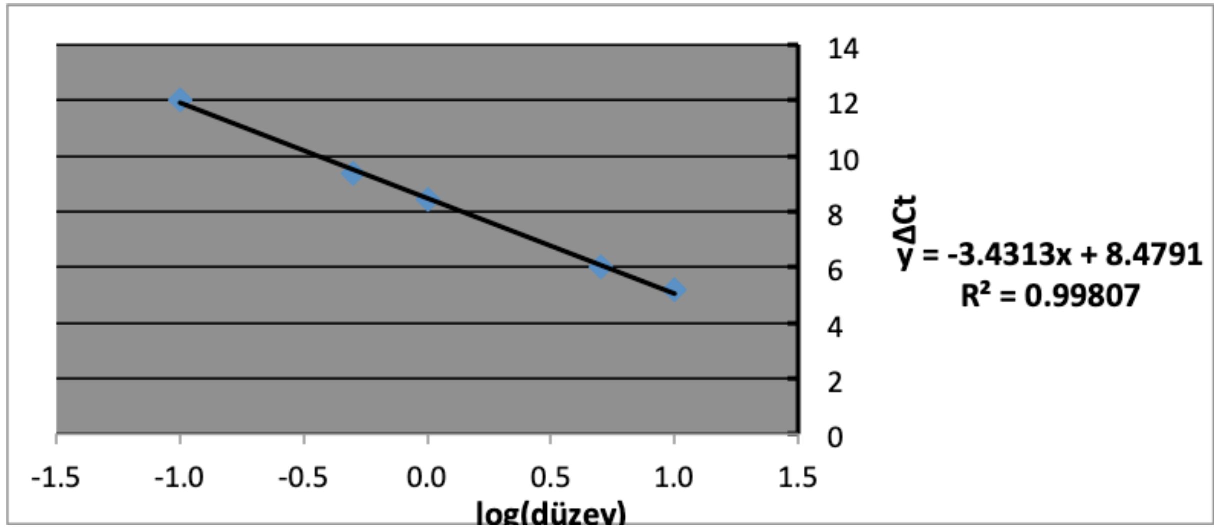
HU-2A, HU-3A ve HU-4A matrisinin MON87701 çeşidi için oluşturulan kalibrasyon eğrisinin R^2 değeri 0,99 ve eğimi -3,1736 olarak bulunmuş olup -3,1 ile -3,6 arasında olduğu için güven aralığı içerisindedir.

4.2.1.2.8. Stabilite Testi

Yeterlilik test kiti matrislerinin oluşturulmasından dağıtıma çıkmasına kadar geçen 6 aylık sürede stabilitede ne kadar değişimin olduğunu saptamak için doğruluk ve tekrarlanabilirlik değerleri ölçülmüştür. İlk aşamada homojenlik testinde ölçülen ve doğruluk testinde %25'lik sınırın dışında kalan sonuçlar nitel olarak stabilite testine sokulmuştur. HU-1A, HU-2A ,HU-3A ve HU-4A için yapılan stabilite testlerinde PCR görüntüleri Şekil 4.25 ve Şekil 4.34'degösterilmiştir. Doğruluk ve RSD_r değerleri aşağıda Tablo 4.31, 4.32,4.33 ve 4.33'de örnekler için sıraylaverilmiştir.

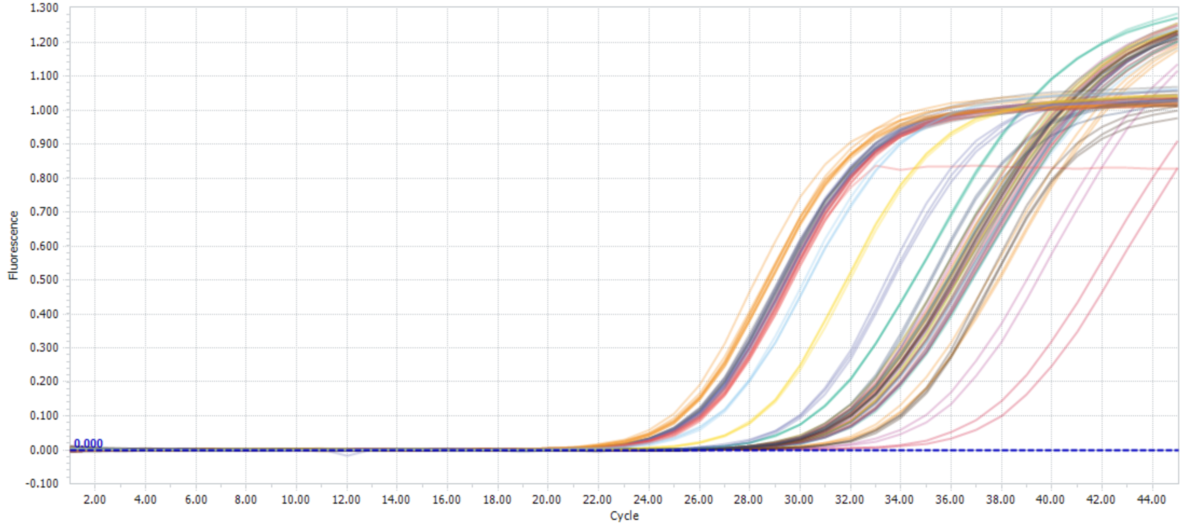


Şekil 4.25. HU-1A için yapılan stabilite testi doğruluk değerlendirmesinde oluşan PCR amplifikasyon eğrisi görüntüsü

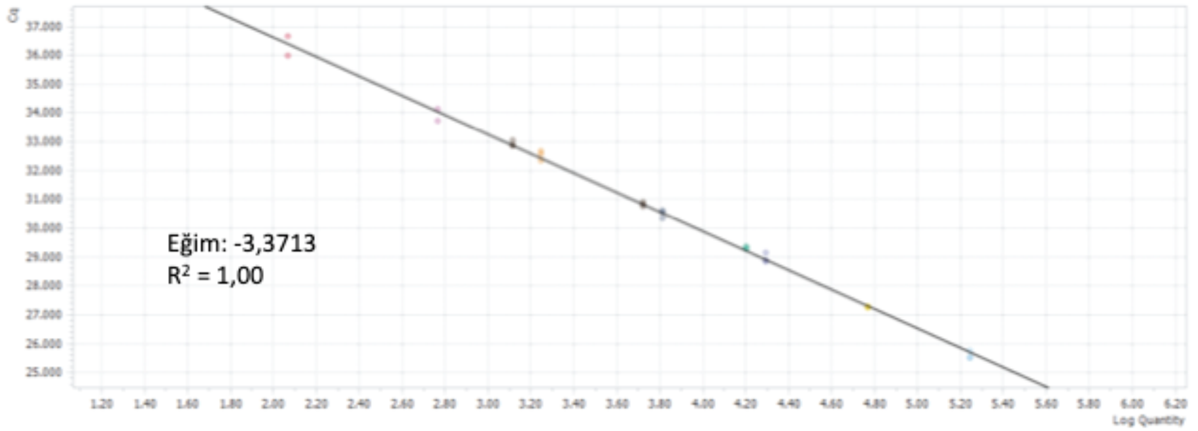


Şekil 4.26. HU-1A için yapılan stabilite testi doğruluk değerlendirmesinde kullanılan standart eğri

HU-1A matrisinin MIR604 çeşidi için oluşturulan kalibrasyon eğrisinin R^2 değeri 0,99807 ve eğimi -3,4313 olarak bulunmuştur ve -3,1 ile -3,6 arasında olduğu için güven aralığı içerisindedir.

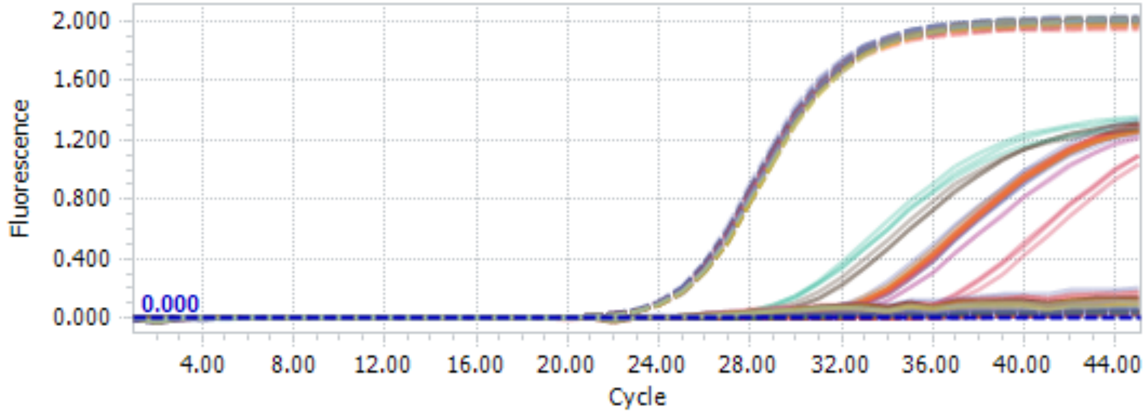


Şekil 4.27. HU-2A ve HU-3A MON87701 çeşidi için yapılan stabilite testi doğruluk değerlendirmesinde oluşan PCR amplifikasyon eğrisi görüntüsü

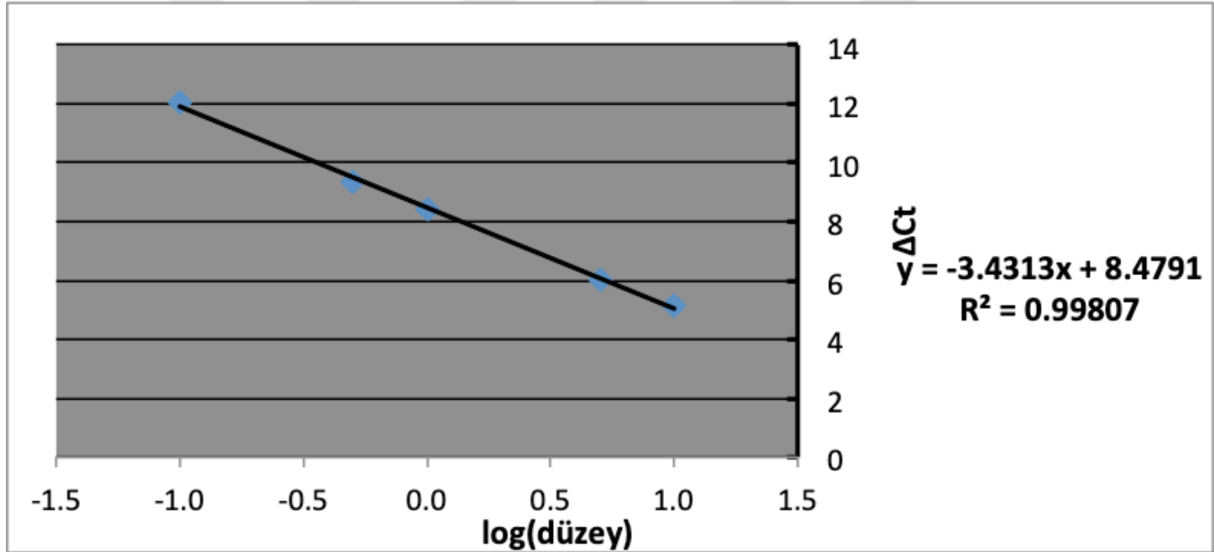


Şekil 4.28. HU-2A ve HU-3A MON87701 çeşidi için yapılan stabilite testi doğruluk değerlendirmesinde kullanılan standart eğri

HU-2A ve HU-3A matrisinin MON87701 çeşidi için oluşturulan kalibrasyon eğrisinin R^2 değeri 1,00 ve eğimi -3,3713 olarak bulunmuştur ve -3,1 ile -3,6 arasında olduğu için güven aralığı içerisindedir.

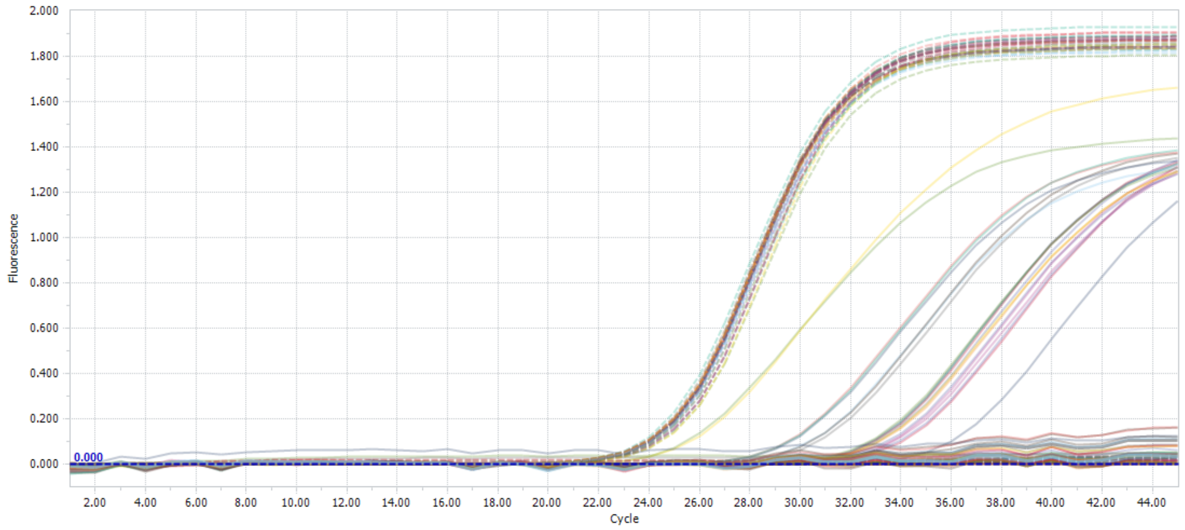


Şekil 4.29. HU-3A MIR604 çeşidi için yapılan stabilite var/yok analizi değerlendirmesinde oluşan PCR amplifikasyon eğrisi görüntüsü

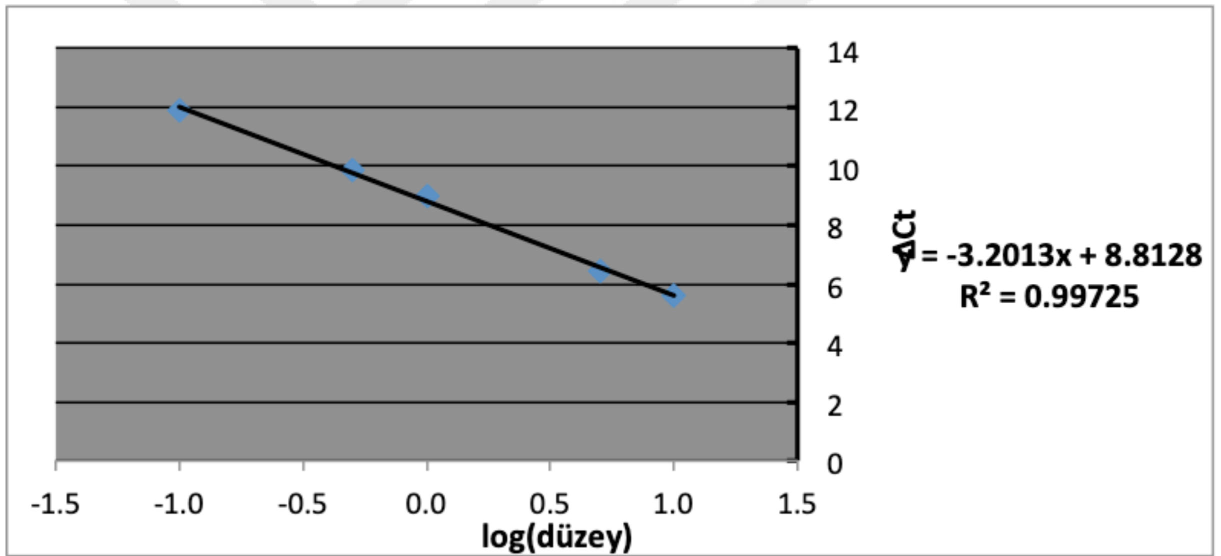


Şekil 4.30. HU-3A MIR604 çeşidi için yapılan stabilite analizi değerlendirmesinde kullanılan standart eğri

HU-3A matrisinin MIR604 çeşidi için oluşturulan kalibrasyon eğrisinin R^2 değeri 0,99807 ve eğimi -3,4313 olarak bulunmuştur ve -3,1 ile -3,6 arasında olduğu için güven aralığı içerisindedir.

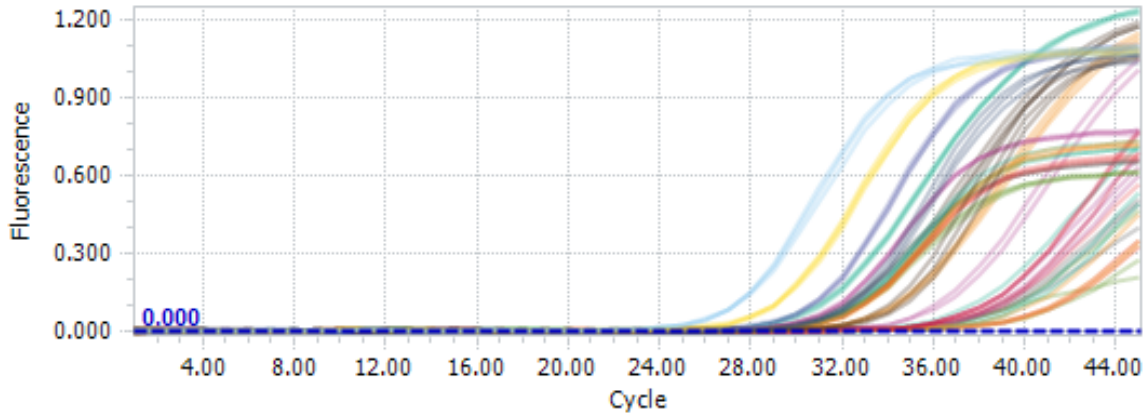


Şekil 4.31. HU-4A, MIR604 hedef bölgesi için yapılan stabilite testinde oluşan PCR amplifikasyon eğrisi görüntüsü

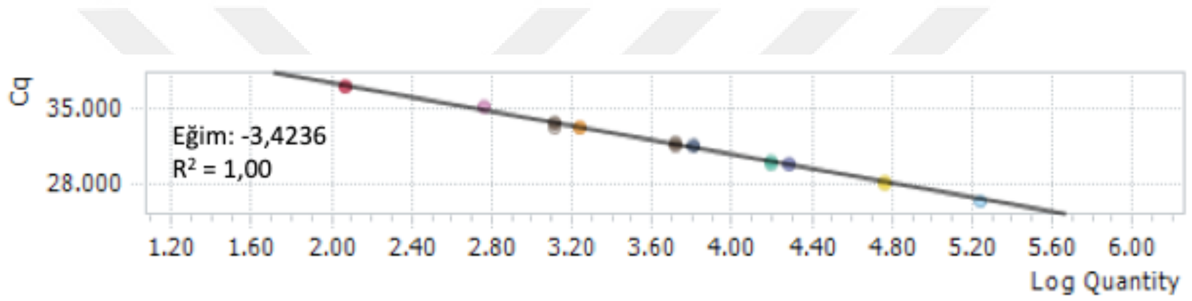


Şekil 4.32. HU-4A, MIR604 hedef bölgesi için yapılan stabilite testi değerlendirmesinde kullanılan standart eğri

HU-4A matrisinin MIR604 çeşidi için oluşturulan kalibrasyon eğrisinin R^2 değeri 0,99725 ve eğimi -3,2013 olarak bulunmuştur ve -3,1 ile -3,6 arasında olduğu için güven aralığı içerisindedir.



Şekil 4.33. HU-4A, MON87701 hedef bölgesi için yapılan stabilite testinde oluşan PCR amplifikasyon eğrisi görüntüsü



Şekil 4.34. HU-4A, MON87701 hedef bölgesi için yapılan stabilite testi var/yok analizi değerlendirmesinde kullanılan standart eğri

HU-4A matrisinin MON87701 çeşidi için oluşturulan kalibrasyon eğrisinin R^2 değeri 1,00 ve eğimi -3,4236 olarak bulunmuştur ve -3,1 ile -3,6 arasında olduğu için güven aralığı içerisindedir.

Tablo 4.31. Yeterlilik test kiti matrisleri için stabilite testi nicel analiz doğruluk sonuçları

	DÜZEY	REPLİKELER	ORTALAMA	DOĞRULUK %	DÜZEY	REPLİKELER	ORTALAMA	DOĞRULUK %
HU-1A MATRİSİ	1%	0,99	0,90	91	1%	0,65	0,76	76,00
		0,75				1,02		
		0,92				0,71		
		0,97				0,66		
	1%	0,94	0,87	88	1%	0,82	0,88	88,00
		0,82				0,75		
		0,84				0,78		
		0,90				1,17		
HU-2A MATRİSİ	2%	1,27	1,20	60	2%	1,19	1,23	61,50
		1,07				1,17		
		1,30				1,16		
		1,18				1,40		
	2%	1,70	1,50	75	2%	1,52	1,34	67,00
		1,48				1,11		
		1,38				1,21		
		1,42				1,50		
HU-3A MATRİSİ (MON87701)	2%	1,29	1,51	76	2%	1,18	1,54	77,00
		1,28				1,68		
		1,62				1,51		
		1,85				1,81		
	2%	1,42	1,51	76	2%	1,60	1,58	79,00
		1,46				1,30		
		1,39				1,85		
		1,76				1,56		

Homojenlik doğruluk testlerinde HU-1A, HU-2A ve HU-3A MON87701 çeşitlerinin doğruluk değerleri %25'den küçük bulunduğu için stabilitede nicel olarak doğruluk testi analizleri yapılmıştır. Bu testler sonucunda HU-1A ve HU-3A stabilite doğruluk testlerinde doğruluk değeri %25'den küçük bulunduğu için uygundur ve bunun yanı sıra HU-2A matrisinin doğruluk değeri %25'in üzerindedir. Bu nedenle laboratuvarlararası karşılaştırma testinde HU-2A için TS EN ISO/IEC 17043 dokümanında da belirtildiği üzere deney numunesi üzerinde bir veya daha fazla özelliğin belirtilmesi veya tanımlanması amaçlandığında yapılan nitel analiz şeklinde analiz sonucunun istenmesine karar verilmiştir[3].

Tablo 4.32. Yeterlilik test kiti matrisleri stabilite testi tekrarlanabilirlik testi sonuçları

	ÖRNEK ADI:	**Ölçülen GDO Oranı**	**Örneklerin Ortalaması**	**Atanmış Değer**	**Standart Sapma**	**%RSDr**
HU-1A MATRİSİ	1	0,990	0,910	**1,00**	0,109	16,92%
		0,750				
		0,920				
		0,970				
	2	0,940	0,880		0,055	
		0,820				
		0,840				
		0,900				
	3	0,650	0,760		0,175	
		1,020				
		0,710				
		0,660				
	4	0,820	0,880		0,195	
		0,750				
		0,780				
		1,170				
HU-2A MATRİSİ	1	1,272	1,200	2,00	0,104	11,25%
		1,072				
		1,307				
		1,188				
	2	1,706	1,500		0,143	
		1,488				
		1,381				
		1,428				
	3	1,196	1,230		0,116	
		1,172				
		1,164				
		1,409				
	4	1,529	1,340		0,208	
		1,117				
		1,213				
		1,509				
HU-3A MATRİSİ (MON87701)	1	1,290	1,510	2,00	0,275	15,58%
		1,280				
		1,620				
		1,850				
	2	1,420	1,510		0,171	
		1,460				
		1,390				
		1,760				
	3	1,180	1,540		0,274	
		1,680				
		1,510				
		1,810				
	4	1,600	1,580		0,223	
		1,300				
		1,850				
		1,560				
HU-4A MATRİSİ (MIR604)	1	0,130	0,150	2,00	0,029	9,66%
		0,190				
		0,140				
	2	0,190	0,200		0,007	
		0,190				
		0,210				
HU-4A MATRİSİ (MON87701)	1	0,660	0,750	2,00	0,147	10,17%
		0,920				
		0,670				
	2	0,960	0,976		0,037	
		0,950				
		1,020				

Tablo 4.32'deki RSD_r değerleri %25'den küçük olduğu için uygundur.

Tablo 4.33. Yeterlilik test kiti matrisleri stabilite testi nitel(var/yok) analiz doğruluk sonuçları

	ÖRNEK ADI	ARANAN GD ÇEŞİDİ	VAR/YOK (+/-)	DOĞRULUK
HU-2A MATRİSİ	1	MON87701	+	100%
			+	
			+	
			+	
	2		+	
			+	
			+	
			+	
	3		+	
			+	
			+	
			+	
	4		+	
			+	
			+	
			+	
HU-3A MATRİSİ	1	MIR604	+	100%
			+	
			+	
			+	
	2		+	
			+	
			+	
			+	
	3		+	
			+	
			+	
			+	
	4		+	
			+	
			+	
			+	
HU-4A MATRİSİ	1	MON87701	+	100%
			+	
			+	
			+	
	2		+	
			+	
			+	
			+	
	3		+	
			+	
			+	
			+	
	4		+	
			+	
			+	
			+	
	1	MIR604	+	100%
			+	
			+	
			+	
	2		+	
			+	
			+	
			+	

Tablo 4.33’de HU-2A MON87701 çeşidi, HU-3A MIR604 çeşidi ve HU-4A MON87701 ve MIR604 çeşidi doğruluk değerleri %25 aralığı dışında kaldığından stabilite nitel olarak ölçülüp doğruluk değerleri %100 olarak bulunmuştur.

4.3. Laboratuvarlar Arası Karşılaştırma Testi

4.3.1. DNA Konsantrasyonu ve Değişim Katsayısı

Laboratuvarların yeterlilik test kiti matrislerinden ekstrakte ettikleri ortalama DNA konsantrasyonları ile DNA konsantrasyonlarına ait değişim katsayıları Tablo 4.34’de verilmiştir.

Laboratuvarların DNA ekstraksiyonu laboratuvarımızda elde edilen DNA ekstraksiyonları ile karşılaştırıldığında daha düşük olduğu gözlenmiştir. PCR cihazı ve kullanılan yöntem farklılığı bakımından elde edilen DNA konsantrasyonları arasında farklar olabilmektedir.

DNA ekstraksiyon verilerinden elde edilen değişim katsayıları laboratuvarların kullandıkları metodun kontrol edilebilirliğinin önemli bir göstergesidir. Tablodaki verilere göre U-3 laboratuvarının HU-3 yeterlilik test kiti matrisinde değişim katsayısı HU-3A için 64,45 ve HU-3B için 96,44 olup oldukça yüksektir. Tabloya göre U-3 laboratuvarının HU-4A matrisi için ekstrakte edilen DNA’lardan 49,23 ve HU-4B matrisi için 35,87 değişim katsayısı elde ettiği hesaplanmıştır.

Değişim katsayısının değeri ne kadar artar ise yöntem üzerine kontrol edilebilirlik o kadar uzaklaştığı için U-3 laboratuvarının kullandığı DNA ekstraksiyonu metodunun gözden geçirmesi bundan sonraki analizlerinde daha verimli sonuçlar alması bakımından önemlidir.

Tablo 4.34. Katılımcı laboratuvarların Yeterlilik Test Numunesi için Ortalama DNA Konsantrasyonu Değerleri (Mean) ve Değişim Katsayısı (Coefficient of variation) değerleri

	Laboratuvar	**Ortalama DNA Konsantrasyonu (ng/µL)**		**Değişim Katsayısı**	
HU-1 Yeterlilik Test Numunesi		**HU-1A**	**HU-1B**	**HU-1A**	**HU-1B**
	U-1				
	U-2	73,00	102,00		
	U-3	67,45	72,10	18,55	27,06
	U-4	284,38	442,85	0,35	0,67
	U-5	50,00	42,50	13,64	32,41
	U-6	155,33		21,56	
	U-7	33,86	28,17	4,67	33,98
	U-8	150,20	155,74		
	U-9	1237,91	423,10	22,87	8,18
	U-10	474,00	443,45	13,87	9,93
HU-2 Yeterlilik Test Numunesi		**HU-2A**	**HU-2B**	**HU-2A**	**HU-2B**
	U-1				
	U-2	205,00	124,00		
	U-3	97,15	93,75	27,58	0,37
	U-4	1168,25	1166,55	0,01	0
	U-5	37,00	36,00	13,93	11,44
	U-6	96,33		2,16	
	U-7	38,54	35,88	18,78	17,99
	U-8	75,80	65,53	3,64	
	U-9	937,43	1136,00	33,11	11,88
	U-10	848,23	1251,00	24,21	1,17
HU-3 Yeterlilik Test Numunesi		**HU-3A**	**HU-3B**	**HU-3A**	**HU-3B**
	U-1				
	U-2	63,00	75,00		
	U-3	88,75	210,35	64,45	96,44
	U-4	883,32	1067,30	1,09	0,03
	U-5	40,38	59,85	3,70	11,25
	U-6	78,00		8,00	
	U-7	23,98	29,27	9,25	88,81
	U-8	107,96	173,59		
	U-9	1291,21	1483,15	29,63	14,42
	U-10	1072,85	1348,65	22,94	3,17
HU-4 Yeterlilik Test Numunesi		**HU-4A**	**HU-4B**	**HU-4A**	**HU-4B**
	U-1				
	U-2	123,00	67,00		
	U-3	166,30	136,40	49,23	35,87
	U-4	226,99	233,80	0,43	0,60
	U-5	118,39	56,60	15,9	20,68
	U-6	94,66		8,98	
	U-7	11,09	6,42	2,61	54,91
	U-8	104,12	79,11		49,93
	U-9	161,45	56,95	27,96	22,56
	U-10	216,75	61,00	30,56	9,27

4.3.2. Genetik Elementler Nitel Sonucu

Tablo 4.35'de verilen HU-1A için tüm laboratuvarların genetik elementler için nitel sonuçları uygun bulunmuştur.

Tablo 4.35. HU-1A için genetik elementler nitel sonucu

Laboratuvar Numarası	p35S			tNOS			bar			pFMV		
	Uyumluluk %100 Saptanmadı (Negatif)			Uyumluluk %100 Saptandı (Pozitif)			Uyumluluk %100 Saptanmadı (Negatif)			Uyumluluk %100 Saptanmadı (Negatif)		
	(Beklenen sonuç: Saptanmadı)			(Beklenen sonuç: Saptandı)			(Beklenen sonuç: Saptanmadı)			(Beklenen sonuç: Saptanmadı)		
	Sonuç	LOD	D	Sonuç	LOD	D	Sonuç	LOD	D	Sonuç	LOD	D
U-1												
U-2	-	10	U	+	10	U				-	10	U
U-3	-	10	U	+	10	U	-	10	U	-	10	U
U-4	-	10	U	+	10	U				-	10	U
U-5	-		U	+		U	-		U	-		U
U-6	-		U	+		U				-		U
U-7	-	10	U	+	10	U				-	10	U
U-8	-	10	U	+	10	U				-	10	U
U-9												
U-10												

LOD: Tespit Limiti, U: Uygun, UD: Uygun Değil, D: Değerlendirme, (+): Saptandı, (-): Saptanmadı.

Tablo 4.36'da, yeterlilik testi sonuçlarında U-6 ve U-8 laboratuvarlarının tNOS saptanmasındaki değerleri uygun olmadığı, ancak diğer katılımcı laboratuvarların sonuçlarının beklenen değere uygun olduğu görülmüştür.

Tablo 4.36. HU-1B için genetik elementler nitel sonucu

Laboratuvar Numarası	p35S			tNOS			bar			pFMV		
	Uyumluluk %100 Saptanmadı (Negatif)			Uyumluluk %71,4 Saptanmadı (Negatif)			Uyumluluk %100 Saptanmadı (Negatif)			Uyumluluk %100 Saptanmadı (Negatif)		
	(Beklenen sonuç: Saptanmadı)			(Beklenen sonuç: Saptanmadı)			(Beklenen sonuç: Saptanmadı)			(Beklenen sonuç: Saptanmadı)		
	Sonuç	LOD	D	Sonuç	LOD	D	Sonuç	LOD	D	Sonuç	LOD	D
U-1												
U-2	-	10	U	-	10	U				-	10	U
U-3	-	10	U	-	10	U	-	10	U	-	10	U
U-4	-	10	U	-	10	U				-	10	U
U-5	-		U	-		U	-		U	-		U
U-6	-		U	+		*UD*				-		U
U-7	-	10	U	-	10	U				-	10	U

U-8	-	10	U	+	10	*UD*				-	10	U
U-9												
U-10												

LOD: Tespit Limiti, U: Uygun, UD: Uygun Değil, D: Değerlendirme, (+): Saptandı, (-): Saptanmadı.

Tablo 4.37'de yeterlilik testi sonuçlarında U-7 ve U-8 laboratuvarlarının farklı saptama bölgeleri için değerlerinin uygun olmadığı, buna karşın diğer katılımcı laboratuvarların sonuçlarının beklenen değere uygun olduğu görülmüştür.

Tablo 4.37. HU-2A için genetik elementler nitel sonucu

Laboratuvar Numarası	**p35S**			**tNOS**			**bar**			**pFMV**		
	Uyumluluk %85,7 Saptanmadı (Negatif)			Uyumluluk %85,7 Saptanmadı (Negatif)			Uyumluluk %100 Saptanmadı (Negatif)			Uyumluluk %85,7 Saptanmadı (Negatif)		
	(Beklenen sonuç: Saptanmadı)			(Beklenen sonuç: Saptanmadı)			(Beklenen sonuç: Saptanmadı)			(Beklenen sonuç: Saptanmadı)		
	Sonuç	LOD	D	Sonuç	LOD	D	Sonuç	LOD	D	Sonuç	LOD	D
U-1												
U-2	-	10	U	-	10	U				-	10	U
U-3	-	10	U	-	10	U	-	10	U	-	10	U
U-4	-	10	U	-	10	U				-	10	U
U-5	-		U	-		U	-		U	-		U
U-6	-		U	-		U				-		U
U-7	-	10	U	-	10	U				+	10	*UD*
U-8	+	10	*UD*	+	10	*UD*				-	10	U
U-9												
U-10												

LOD: Tespit Limiti, U: Uygun, UD: Uygun Değil, D: Değerlendirme, (+): Saptandı, (-): Saptanmadı.

Tablo 4.38'de yeterlilik testi sonuçlarında U-3 ve U-8 laboratuvarlarının p35S saptanmasındaki değerleri uygun olmadığı ve U-8 laboratuvarın tNOS bölgesi için uygun olmadığını, ancak diğer katılımcı laboratuvarların sonuçlarının beklenen değere uygun olduğu görülmüştür.

Tablo 4.38. HU-2B için genetik elementler nitel sonucu

Laboratuvar Numarası	**p35S**			**tNOS**			**bar**			**pFMV**		
	Uyumluluk %71,4 Saptanmadı (Negatif)			Uyumluluk %85,7 Saptanmadı (Negatif)			Uyumluluk %100 Saptanmadı (Negatif)			Uyumluluk %100 Saptanmadı (Negatif)		
	(Beklenen sonuç: Saptanmadı)			(Beklenen sonuç: Saptanmadı)			(Beklenen sonuç: Saptanmadı)			(Beklenen sonuç: Saptanmadı)		
	Sonuç	LOD	D	Sonuç	LOD	D	Sonuç	LOD	D	Sonuç	LOD	D
U-1												

U-2	-	10	U	-	10	U				-	10	U
U-3	+	10	*UD*	-	10	U	-	10	U	-	10	U
U-4	-	10	U	-	10	U				-	10	U
U-5	-		U	-		U	-		U	-		U
U-6	-		U	-		U				-		U
U-7	-	10	U	-	10	U				-	10	U
U-8	+	10	*UD*	+	10	*UD*				-	10	U
U-9												
U-10												

LOD: Tespit Limiti, U: Uygun, UD: Uygun Değil, D: Değerlendirme, (+): Saptandı, (-): Saptanmadı.

Tablo 4.39'da yeterlilik testi sonuçlarında U-8 laboratuvarın p35S saptanmasındaki değerlerinin uygun olmadığı, ancak diğer katılımcı laboratuvarların sonuçlarının beklenen değere uygun olduğu görülmüştür.

Tablo 4.39. HU-3A için genetik elementler nitel sonucu

Laboratuvar Numarası	p35S			tNOS			bar			pFMV		
	Uyumluluk %85,7 Saptanmadı (Negatif)			Uyumluluk %100 Saptandı (Pozitif)			Uyumluluk %100 Saptanmadı (Negatif)			Uyumluluk %100 Saptanmadı (Negatif)		
	(Beklenen sonuç: Saptanmadı)			(Beklenen sonuç: Saptandı)			(Beklenen sonuç: Saptanmadı)			(Beklenen sonuç: Saptanmadı)		
	Sonuç	LOD	D	Sonuç	LOD	D	Sonuç	LOD	D	Sonuç	LOD	D
U-1												
U-2	-	10	U	+	10	U				-	10	U
U-3	-	10	U	+	10	U	-	10	U	-	10	U
U-4	-	10	U	+	10	U				-	10	U
U-5	-		U	+		U	-		U	-		U
U-6	-		U	+		U				-		U
U-7	-	10	U	+	10	U				-	10	U
U-8	+	10	*UD*	+	10	U				-	10	U
U-9												
U-10												

LOD: Tespit Limiti, U: Uygun, UD: Uygun Değil, D: Değerlendirme, (+): Saptandı, (-): Saptanmadı.

Tablo 4.40' yeterlilik testi sonuçlarında U-6 ve U-8 laboratuvarlarının tNOS saptanmasındaki değerlerinin uygun olmadığı ve U-8 laboratuvarın p35S saptanmasındaki değerinin uygun olmadığı, ancak diğer katılımcı laboratuvarların sonuçlarının beklenen değere uygun olduğu görülmüştür.

Tablo 4.40. HU-3B için genetik elementler nitel sonucu

Laboratuvar Numarası	p35S			tNOS			bar			pFMV		
	Uyumluluk %85,7 Saptanmadı (Negatif)			Uyumluluk %71,4 Saptanmadı (Negatif)			Uyumluluk %100 Saptanmadı (Negatif)			Uyumluluk %100 Saptanmadı (Negatif)		
	(Beklenen sonuç: Saptanmadı)			(Beklenen sonuç: Saptanmadı)			(Beklenen sonuç: Saptanmadı)			(Beklenen sonuç: Saptanmadı)		
	Sonuç	LOD	D	Sonuç	LOD	D	Sonuç	LOD	D	Sonuç	LOD	D
U-1												
U-2	-	10	U	-	10	U				-	10	U
U-3	-	10	U	-	10	U	-	10	U	-	10	U
U-4	-	10	U	-	10	U				-	10	U
U-5	-		U	-		U	-		U	-		U
U-6	-		U	+		*UD*				-		U
U-7	-	10	U	-	10	U				-	10	U
U-8	+	10	*UD*	+	10	*UD*				-	10	U
U-9												
U-10												

LOD: Tespit Limiti, U: Uygun, UD: Uygun Değil, D: Değerlendirme, (+): Saptandı, (-): Saptanmadı.

Tablo 4.41'de verilen sonuçlar katılımcı laboratuvarlarının HU-4A için genetik elementlerin nitel sonucunu içermektedir. Laboratuvarlardan sadece U-5 laboratuvarı tNOS terminatörünü saptayamamıştır. U-5 laboratuvarının HU-4 matrisleri için Tablo 4.34'deki ekstraksiyon sonuçlarına baktığımızda normalde daha az DNA konsantrasyonu beklediğimiz bu matristen diğer matrislere göre daha fazla miktarda DNA elde ettikleri görülmektedir. Diğer katılımcı laboratuvarların elde ettikleri ve ilettikleri değer beklenen değere uygundur.

Tablo 4.41. HU-4A için genetik elementler nitel sonucu

Laboratuvar Numarası	p35S			tNOS			bar			pFMV		
	Uyumluluk %100 Saptanmadı (Negatif)			Uyumluluk %85,7 Saptandı (Pozitif)			Uyumluluk %100 Saptanmadı (Negatif)			Uyumluluk %100 Saptanmadı (Negatif)		
	(Beklenen sonuç: Saptanmadı)			(Beklenen sonuç: Saptandı)			(Beklenen sonuç: Saptanmadı)			(Beklenen sonuç: Saptanmadı)		
	Sonuç	LOD	D	Sonuç	LOD	D	Sonuç	LOD	D	Sonuç	LOD	D
U-1												
U-2	-	10	U	+	10	U				-	10	U
U-3	-	10	U	+	10	U	-	10	U	-	10	U
U-4	-	10	U	+	10	U				-	10	U
U-5	-		U	-		*UD*	-		U	-		U
U-6	-		U	+		U				-		U
U-7	-	10	U	+	10	U				-	10	U

U-8	-	10	U	+	10	U				-	10	U
U-9												
U-10												

LOD: Tespit Limiti, U: Uygun, UD: Uygun Değil, D: Değerlendirme, (+): Saptandı, (-): Saptanmadı.

Tablo 4.42'de yeterlilik testi sonuçlarında U-4 ve U-6 laboratuvarlarının tNOS saptanmasındaki değerlerinin uygun olmadığı, ancak diğer katılımcı laboratuvarların sonuçlarının beklenen değere uygun olduğu görülmüştür.

Tablo 4.42. HU-4B için genetik elementler nitel sonucu

Laboratuvar Numarası	**p35S**			**tNOS**			**bar**			**pFMV**		
	Uyumluluk %100 Saptanmadı (Negatif)			Uyumluluk %71,4 Saptanmadı (Negatif)			Uyumluluk %100 Saptanmadı (Negatif)			Uyumluluk %100 Saptanmadı (Negatif)		
	(Beklenen sonuç: Saptanmadı)			(Beklenen sonuç: Saptanmadı)			(Beklenen sonuç: Saptanmadı)			(Beklenen sonuç: Saptanmadı)		
	Sonuç	LOD	D	Sonuç	LOD	D	Sonuç	LOD	D	Sonuç	LOD	D
U-1												
U-2	-	10	U	-	10	U				-	10	U
U-3	-	10	U	-	10	U	-	10	U	-	10	U
U-4	-	10	U	+	10	*UD*				-	10	U
U-5	-		U	-		U	-		U	-		U
U-6	-		U	+		*UD*				-		U
U-7	-	10	U	-	10	U				-	10	U
U-8	-	10	U	-	10	U				-	10	U
U-9												
U-10												

LOD: Tespit Limiti, U: Uygun, UD: Uygun Değil, D: Değerlendirme, (+): Saptandı, (-): Saptanmadı.

4.3.3. Tip Belirleme Nitel Sonucu

Tablo 4.43’ de HU-1A için katılımcı laboratuvarlar tarafından iletilen tip belirleme nitel sonuçları verilmiştir. Raporlanması gereken matrisler içinde MIR604, GA21, 3272, MIR162, DAS40278-9 çeşitleri bulunmaktadır. Tüm laboratuvarların sonuçları başarılı bulunmuştur ve sonuçlar beklenen değerler ile uygun bulunmuştur. GA-21, 3272, MIR162 ve DAS40278-9 GD çeşitleri için bu çalışma kapsamında verifikasyon çalışması yapılmamakla birlikte U-9 ve U-10 katılımcı laboratuvar olarak çalışmada kullanılan sonuçların tutarlılığı güvence altına alınmıştır.

Tablo 4.43. HU-1A için Tip Belirleme Nitel Sonuç ve Değerlendirme

Laboratuvar Numarası	MIR604			GA21			3272			MIR162			DAS40278-9		
	Uyumluluk %100 Saptandı (Pozitif)			Uyumluluk %100 Saptanmadı (Negatif)			Uyumluluk %100 Saptanmadı (Negatif)			Uyumluluk %100 Saptanmadı (Negatif)			Uyumluluk %100 Saptanmadı (Negatif)		
	(Beklenen sonuç: Saptandı)			(Beklenen sonuç: Saptanmadı)			(Beklenen sonuç: Saptanmadı)			(Beklenen sonuç: Saptanmadı)			(Beklenen sonuç: Saptanmadı)		
	Sonuç	LOD	D	Sonuç	LOD	D	Sonuç	LOD	D	Sonuç	LOD	D	Sonuç	LOD	D
U-1															
U-2													-		U
U-3	+		B	-		U	-		U	-		U	-		U
U-4															
U-5	+		B	-		U	-		U	-		U	-		U
U-6	+		B												
U-7													-		U
U-8													-	10	U
U-9	+	8	B												
U-10	+	8	B												

LOD: Tespit Sınırı, D: Değerlendirme, B: Başarılı, BD: Başarılı Değil, U: Uygun, UD: Uygun Değil, (+): Saptandı, (-): Saptanmadı

Tablo 4.44’ de HU-1B için laboratuvarlardan tip belirleme nitel sonuçlarını raporlamaları istenmiştir. Raporlanması gereken matrisler içinde MIR604, GA21, 3272, MIR162, DAS40278-9 çeşitleri bulunmaktadır. U-6 laboratuvarı dışında diğer katılımcı laboratuvarların sonuçları başarılı bulunmuş olup katılımcı laboratuvarların tamamı için sonuçlar beklenen değer ile uygun bulunmuştur.

Tablo 4.44. HU-1B için Tip Belirleme Nitel Sonuç ve Değerlendirme

Laboratuvar Numarası	MIR604			GA21			3272			MIR162			DAS40278-9		
	Uyumluluk %80 Saptanmadı (Negatif)			Uyumluluk %100 Saptanmadı (Negatif)			Uyumluluk %100 Saptanmadı (Negatif)			Uyumluluk %100 Saptanmadı (Negatif)			Uyumluluk %100 Saptanmadı (Negatif)		
	(Beklenen sonuç: Saptanmadı)			(Beklenen sonuç: Saptanmadı)			(Beklenen sonuç: Saptanmadı)			(Beklenen sonuç: Saptanmadı)			(Beklenen sonuç: Saptanmadı)		
	Sonuç	LOD	D	Sonuç	LOD	D	Sonuç	LOD	D	Sonuç	LOD	D	Sonuç	LOD	D
U-1															
U-2													-		U
U-3	-		B	-		U	-		U	-		U	-		U
U-4															
U-5	-		B	-		U	-		U	-		U	-		U
U-6	+		*BD*												
U-7													-		U
U-8													-	10	U
U-9	-	8	B												
U-10	-	8	B												

LOD: Tespit Sınırı, D: Değerlendirme, B: Başarılı, BD: Başarılı Değil, U: Uygun, UD: Uygun Değil, (+): Saptandı, (-): Saptanmadı

Tablo 4.45' de HU-2A için laboratuvarlardan tip belirleme nitel sonuçlarını raporlamaları istenmiştir. Raporlanması gereken matrisler içinde MON87701, CV127, DP305423, MON87708, MON87769 çeşitleri bulunmaktadır. Tüm laboratuvarların sonuçları başarılıdır. U-9 ve U-10 kodu ile yeterlilik testine katılan bu tezin gerçekleştirildiği laboratuvar olarak yalnızca MON87701 soya için sonuç verilmiştir.

Tablo 4.45. HU-2A için Tip Belirleme Nitel Sonuç ve Değerlendirme

Laboratuvar Numarası	MON87701			CV127			DP305423			MON87708			MON87769		
	Uyumluluk %100 Saptandı (Pozitif)			Uyumluluk %100 Saptanmadı (Negatif)			Uyumluluk %100 Saptanmadı (Negatif)			Uyumluluk %100 Saptanmadı (Negatif)			Uyumluluk %100 Saptanmadı (Negatif)		
	(Beklenen sonuç: Saptandı)			(Beklenen sonuç: Saptanmadı)			(Beklenen sonuç: Saptanmadı)			(Beklenen sonuç: Saptanmadı)			(Beklenen sonuç: Saptanmadı)		
	Sonuç	LOD	D	Sonuç	LOD	D	Sonuç	LOD	D	Sonuç	LOD	D	Sonuç	LOD	D
U-1															
U-2	+		B	-		U	-		U	-		U	-		U
U-3	+		B	-		U	-		U	-		U	-		U
U-4	+		B												
U-5	+		B	-		U	-		U	-		U	-		U

U-6	+		B												
U-7	+		B	-		U	-		U	-		U	-		U
U-8	+	5	B	-	10	U	-	10	U	-	10	U	-	5	U
U-9	+	8	B												
U-10	+	8	B												

LOD: Tespit Sınırı, D: Değerlendirme, B: Başarılı, BD: Başarılı Değil, U: Uygun, UD: Uygun Değil, (+): Saptandı, (-): Saptanmadı

Tablo 4.46' da HU-2B için laboratuvarlardan tip belirleme nitel sonuçlarını araporlamaları istenmiştir. Raporlanması gereken matrisler içinde MON87701, CV127, DP305423, MON87708, MON87769 çeşitleri bulunmaktadır. U-6 laboratuvarı dışında tüm katılımcı laboratuvarların sonuçları başarılı bulunmuştur. U-9 ve U-10 nolu katılımcı laboratuvar olarak yer alan Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Araştırma Laboratuvarı ise yalnızca MON87701 GD çeşidi için sonuç vererek diğer laboratuvarlar ile sonuçlar bakımından tutarlılığı gösterilmiştir.

Tablo 4.46. HU-2B için Tip Belirleme Nitel Sonuç ve Değerlendirme

Laboratuvar Numarası	**MON87701**			**CV127**			**DP305423**			**MON87708**			**MON87769**		
	Uyumluluk %88,9 Saptanmadı (Negatif)			Uyumluluk %100 Saptanmadı (Negatif)			Uyumluluk %100 Saptanmadı (Negatif)			Uyumluluk %100 Saptanmadı (Negatif)			Uyumluluk %100 Saptanmadı (Negatif)		
	(Beklenen sonuç: Saptanmadı)			(Beklenen sonuç: Saptanmadı)			(Beklenen sonuç: Saptanmadı)			(Beklenen sonuç: Saptanmadı)			(Beklenen sonuç: Saptanmadı)		
	Sonuç	LOD	D	Sonuç	LOD	D	Sonuç	LOD	D	Sonuç	LOD	D	Sonuç	LOD	D
U-1															
U-2	-		B	-		U	-		U	-		U	-		U
U-3	-		B	-		U	-		U	-		U	-		U
U-4	-		B												
U-5	-		B	-		U	-		U	-		U	-		U
U-6	+		*BD*												
U-7	-		B	-		U	-		U	-		U	-		U
U-8	-	5	B	-	10	U	-	10	U	-	10	U	-	5	U
U-9	-	8	B												
U-10	-	8	B												

LOD: Tespit Sınırı, D: Değerlendirme, B: Başarılı, BD: Başarılı Değil, U: Uygun, UD: Uygun Değil, (+): Saptandı, (-): Saptanmadı

Tablo 4.47’ de HU-3A için laboratuvarlardan tip belirleme nitel sonuçlarını raporlamaları istenmiştir. Raporlanması gereken matrisler içinde MIR604, GA21, 3272, MIR162, DAS40278-9 mısır çeşitleri ve MON87701, CV127, DP305423, MON87708, MON87769 soya çeşitleri bulunmaktadır. Tüm laboratuvarların sonuçları başarılı bulunmuştur.

Tablo 4.47. HU-3A için Tip Belirleme Nitel Sonuç ve Değerlendirme

LABORATUVAR NUMARASI	MIR604		GA21		3272		MIR162		DAS40278-9		MON87701		CV127		DP305423		MON87708		MON87769	
	Uyumluluk %100 Saptandı (Pozitif)		Uyumluluk %100 Saptanmadı (Negatif)		Uyumluluk %100 Saptanmadı (Negatif)		Uyumluluk %100 Saptanmadı (Negatif)		Uyumluluk %100 Saptanmadı (Negatif)		Uyumluluk %100 Saptandı (Pozitif)		Uyumluluk %100 Saptanmadı (Negatif)		Uyumluluk %100 Saptanmadı (Negatif)		Uyumluluk %100 Saptanmadı (Negatif)		Uyumluluk %100 Saptanmadı (Negatif)	
	(Beklenen sonuç: Saptandı)		(Beklenen sonuç: Saptanmadı)		(Beklenen sonuç: Saptanmadı)		(Beklenen sonuç: Saptanmadı		(Beklenen sonuç: Saptanmadı)		(Beklenen sonuç: Saptanmadı)		(Beklenen sonuç: Saptanmadı)		(Beklenen sonuç: Saptanmadı)		(Beklenen sonuç: Saptanmadı)		(Beklenen sonuç: Saptanmadı)	
	Sonuç	Değerlendirme	Sonuç	Değerlendirme	Sonuç	Değerlendirme	Sonuç	Değerlendirme	Sonuç	Değerlendirme	Sonuç	Değerlendirme	Sonuç	Değerlendirme	Sonuç	Değerlendirme	Sonuç	Değerlendirme	Sonuç	Değerlendirme
U-1																				
U-2									-	U	+	B	-	U	-	U	-	U	-	U
U-3	+	B	-	U	-	U	-	U	-	U	+	B	-	U	-	U	-	U	-	U
U-4											+	B								
U-5	+	B	-	U	-	U	-	U	-	U	+	B	-	U	-	U	-	U	-	U
U-6	+	B									+	B								
U-7									-	U	+	B	-	U	-	U	-	U	-	U
U-8									-	U	+	B	-	U	-	U	-	U	-	U
U-9	+	B									+	B								
U-10	+	B									+	B								

D: Değerlendirme, B: Başarılı, BD: Başarılı Değil, U: Uygun, UD: Uygun Değil, (+): Saptandı, (-): Saptanmadı

Tablo 4.48’ de HU-3B için laboratuvarlardan tip belirleme nitel sonuçlarını raporlamaları istenmiştir. Raporlanması gereken matrisler içinde MIR604, GA21, 3272, MIR162, DAS40278-9 mısır çeşitleri ve MON87701, CV127, DP305423, MON87708, MON87769 soya çeşitleri bulunmaktadır. U-6 laboratuvarı kontrol grubu matrisinde MIR604 ve MON87701 çeşidini saptamış olup başarısız olmuştur. Diğer katılımcı laboratuvarların sonuçları başarılı

bulunmuş olup U-9 ve U-10 kodlu araştırma laboratuvarı içinde diğer laboratuvarların sonuçları ile uygun bulunmuştur.

Tablo 4.48. HU-3B için Tip Belirleme Nitel Sonuç ve Değerlendirme

LABORATUVAR NUMARASI	MIR604		GA21		3272		MIR162		DAS40278-9		MON87701		CV127		DP305423		MON87708		MON87769	
	Uyumluluk% 80 Saptanmadı (Negatif)		Uyumluluk %100 Saptanmadı (Negatif)		Uyumluluk %100 Saptanmadı (Negatif)		Uyumluluk %100 Saptanmadı (Negatif)		Uyumluluk %100 Saptanmadı (Negatif)		Uyumluluk %88,9 Saptanmadı (Negatif)		Uyumluluk %100 Saptanmadı (Negatif)		Uyumluluk %100 Saptanmadı (Negatif)		Uyumluluk %100 Saptanmadı (Negatif)		Uyumluluk %100 Saptanmadı (Negatif)	
	(Beklenen sonuç: Saptandı)		(Beklenen sonuç: Saptanmadı)		(Beklenen sonuç: Saptanmadı)		(Beklenen sonuç: Saptanmadı)		(Beklenen sonuç: Saptanmadı)		(Beklenen sonuç: Saptanmadı)		(Beklenen sonuç: Saptanmadı)		(Beklenen sonuç: Saptanmadı)		(Beklenen sonuç: Saptanmadı)		(Beklenen sonuç: Saptanmadı)	
	Sonuç	Değerlendirme	Sonuç	Değerlendirme	Sonuç	Değerlendirme	Sonuç	Değerlendirme	Sonuç	Değerlendirme	Sonuç	Değerlendirme	Sonuç	Değerlendirme	Sonuç	Değerlendirme	Sonuç	Değerlendirme	Sonuç	Değerlendirme
U-1																				
U-2									-	U	-	B	-	U	-	U	-	U	-	U
U-3	-	B	-	U	-	U	-	U	-	U	-	B	-	U	-	U	-	U	-	U
U-4											-	B								
U-5	-	B	-	U	-	U	-	U	-	U	-	B	-	U	-	U	-	U	-	U
U-6	+	*BD*									+	*BD*								
U-7									-	U	-	B	-	U	-	U	-	U	-	U
U-8									-	U	-	B	-	U	-	U	-	U	-	U
U-9	-	B									-	B								
U-10	-	B									-	B								

D: Değerlendirme, B: Başarılı, BD: Başarılı Değil, U: Uygun, UD: Uygun Değil, (+): Saptandı, (-): Saptanmadı

Tablo 4.49' da HU-4A için laboratuvarlardan tip belirleme nitel sonuçlarını raporlamaları istenmiştir. Raporlanması gereken matrisler içinde MIR604, GA21, 3272, MIR162, DAS40278-9 mısır çeşitleri ve MON87701, CV127, DP305423, MON87708, MON87769 soya çeşitleri bulunmaktadır. U-5 laboratuvarı HU-4A matrisinde MIR604 ve MON87701 çeşidini saptayamamış ve başarısız olmuştur. Diğer katılımcı laboratuvarların sonuçları başarılı bulunmuştur.

Tablo 4.49. HU-4A için Tip Belirleme Nitel Sonuç ve Değerlendirme

LABORATUVAR NUMARASI	MIR604		GA21		3272		MIR162		DAS40278-9		MON87701		CV127		DP305423		MON87708		MON87769	
	Uyumluluk %80 Saptandı (Pozitif)		Uyumluluk %100 Saptanmadı (Negatif)		Uyumluluk %100 Saptanmadı (Negatif)		Uyumluluk %100 Saptanmadı (Negatif)		Uyumluluk %100 Saptanmadı (Negatif)		Uyumluluk %88,9 Saptandı (Pozitif)		Uyumluluk %100 Saptanmadı (Negatif)		Uyumluluk %100 Saptanmadı (Negatif)		Uyumluluk %100 Saptanmadı (Negatif)		Uyumluluk %100 Saptanmadı (Negatif)	
	(Beklenen sonuç: Saptandı)		(Beklenen sonuç: Saptanmadı)		(Beklenen sonuç: Saptanmadı)		(Beklenen sonuç: Saptanmadı)		(Beklenen sonuç: Saptanmadı)		(Beklenen sonuç: Saptanmadı)		(Beklenen sonuç: Saptanmadı)		(Beklenen sonuç: Saptanmadı)		(Beklenen sonuç: Saptanmadı)		(Beklenen sonuç: Saptanmadı)	
	Sonuç	Değerlendirme	Sonuç	Değerlendirme	Sonuç	Değerlendirme	Sonuç	Değerlendirme	Sonuç	Değerlendirme	Sonuç	Değerlendirme	Sonuç	Değerlendirme	Sonuç	Değerlendirme	Sonuç	Değerlendirme	Sonuç	Değerlendirme
U-1																				
U-2									-	U	+	B	-	U	-	U	-	U	-	U
U-3	+	B	-	U	-	U	-	U	-	U	+	B	-	U	-	U	-	U	-	U
U-4											+	B								
U-5	-	*BD*	-	U	-	U	-	U	-	U	-	*BD*	-	U	-	U	-	U	-	U
U-6	+	B									+	B								
U-7									-	U	+	B	-	U	-	U	-	U	-	U
U-8									-	U	+	B	-	U	-	U	-	U	-	U
U-9	+	B									+	B								
U-10	+	B									+	B								

D: Değerlendirme, B: Başarılı, BD: Başarılı Değil, U: Uygun, UD: Uygun Değil, (+): Saptandı, (-): Saptanmadı

Tablo 4.50' de HU-4B için laboratuvarlardan tip belirleme nitel sonuçlarını raporlamaları istenmiştir. Raporlanması gereken matrisler içinde MIR604, GA21, 3272, MIR162, DAS40278-9 mısır çeşitleri ve MON87701, CV127, DP305423, MON87708, MON87769 soya çeşitleri bulunmaktadır. U-6 laboratuvarı HU-4B matrisinde MIR604 ve MON87701 çeşidini saptamış ve başarısız olmuştur. U-3 laboratuvarı MIR604 çeşidini saptamış ve başarısız olmuştur. U-4 laboratuvarı ise HU-4B matrisinde MON87701 çeşidini saptamış ve başarısız olmuştur. Diğer katılımcı laboratuvarların sonuçları başarılı bulunmuştur.

Tablo 4.50. HU-4B için Tip Belirleme Nitel Sonuç ve Değerlendirme

LABORATUVAR NUMARASI	MIR604		GA21		3272		MIR162		DAS40278-9		MON87701		CV127		DP305423		MON87708		MON87769	
	Uyumluluk%60 Saptanmadı (Negatif)		Uyumluluk %100 Saptanmadı (Negatif)		Uyumluluk %100 Saptanmadı (Negatif)		Uyumluluk %100 Saptanmadı (Negatif)		Uyumluluk %100 Saptanmadı (Negatif)		Uyumluluk %77,8 Saptanmadı (Negatif)		Uyumluluk %100 Saptanmadı (Negatif)		Uyumluluk %100 Saptanmadı (Negatif)		Uyumluluk %100 Saptanmadı (Negatif)		Uyumluluk %100 Saptanmadı (Negatif)	
	(Beklenen sonuç: Saptandı)		(Beklenen sonuç: Saptanmadı)		(Beklenen sonuç: Saptanmadı)		(Beklenen sonuç: Saptanmadı)		(Beklenen sonuç: Saptanmadı)		(Beklenen sonuç: Saptanmadı)		(Beklenen sonuç: Saptanmadı)		(Beklenen sonuç: Saptanmadı)		(Beklenen sonuç: Saptanmadı)		(Beklenen sonuç: Saptanmadı)	
	Sonuç	Değerlendirme	Sonuç	Değerlendirme	Sonuç	Değerlendirme	Sonuç	Değerlendirme	Sonuç	Değerlendirme	Sonuç	Değerlendirme	Sonuç	Değerlendirme	Sonuç	Değerlendirme	Sonuç	Değerlendirme	Sonuç	Değerlendirme
U-1																				
U-2									-	U	-	B	-	U	-	U	-	U	-	U
U-3	+	*BD*	-	U	-	U	-	U	-	U	-	B	-	U	-	U	-	U	-	U
U-4											+	*BD*								
U-5	-	B	-	U	-	U	-	U	-	U	-	B	-	U	-	U	-	U	-	U
U-6	+	*BD*									+	*BD*								
U-7									-	U	-	B	-	U	-	U	-	U	-	U
U-8									-	U	-	B	-	U	-	U	-	U	-	U
U-9	-	B									-	B								
U-10	-	B									-	B								

D: Değerlendirme, B: Başarılı, BD: Başarılı Değil, U: Uygun, UD: Uygun Değil, (+): Saptandı, (-): Saptanmadı

4.3.4. Genel Değerlendirme

Tablo 4.51' de tüm katılımcı laboratuvarların sonuçlarının karşılaştırılmasındaki uyumluluk sonuçları, başarılı sonuçların sayısı, uygun sonuçlarının sayısı ve yüzdesinin bir özeti sunulmuştur. Genel değerlendirme kapsamında uyumluluk sonucu uygun sonuçların en düşük yüzdesi HU-4B'de yanlış pozitiflik %60 olarak saptanmıştır. Bundan başka %71,4 ile HU-1B ve HU-4B'de tNOS yanlış pozitiflik, HU-2B'de p35s yanlış pozitiflik sonuçları elde edilmiştir. Bu verilerden de anlaşılacağı üzere kontrol gruplarının analizinde GD içeren çeşitleri ile olası kontaminasyonu en büyük hata payını oluşturmaktadır.

Tablo 4.51. Laboratuvarlar Arası Uyumluluk Sonuçları, Başarılı Sonuçların Sayısı ve Yüzdesi, Laboratuvarlar Arası Uyumluluğa Bağlı Uygun Sonuçlar

Numune	Analit	Uyumluluk	Başarılı Sonuç Sayısı	Toplam Sonuç Sayısı	Uyumluluğa Uygun Sonuçların Yüzdesi
HU-1A	p35S	*Saptanmadı*	7	7	100,0
HU-1B		*Saptanmadı*	7	7	100,0
HU-2A		*Saptanmadı*	6	7	**85,7**
HU-2B		*Saptanmadı*	5	7	**71,4**
HU-3A		*Saptanmadı*	6	7	**85,7**
HU-3B		*Saptanmadı*	6	7	**85,7**
HU-4A		*Saptanmadı*	7	7	100,0
HU-4B		*Saptanmadı*	7	7	100,0
HU-1A	tNOS	*Saptandı*	7	7	100,0
HU-1B		*Saptanmadı*	5	7	**71,4**
HU-2A		*Saptanmadı*	6	7	**85,7**
HU-2B		*Saptanmadı*	6	7	**85,7**
HU-3A		*Saptandı*	7	7	100,0
HU-3B		*Saptanmadı*	5	7	**71,4**
HU-4A		*Saptandı*	6	7	**85,7**
HU-4B		*Saptanmadı*	5	7	**71,4**
HU-1A	bar	*Saptanmadı*	7	7	100,0
HU-1B		*Saptanmadı*	7	7	100,0
HU-2A		*Saptanmadı*	7	7	100,0
HU-2B		*Saptanmadı*	7	7	100,0
HU-3A		*Saptanmadı*	7	7	100,0
HU-3B		*Saptanmadı*	7	7	100,0
HU-4A		*Saptanmadı*	7	7	100,0
HU-4B		*Saptanmadı*	7	7	100,0
HU-1A	pFMV	*Saptanmadı*	7	7	100,0
HU-1B		*Saptanmadı*	7	7	100,0
HU-2A		*Saptanmadı*	6	7	**85,7**

HU-2B		*Saptanmadı*	7	7	100,0
HU-3A		*Saptanmadı*	7	7	100,0
HU-3B		*Saptanmadı*	7	7	100,0
HU-4A		*Saptanmadı*	7	7	100,0
HU-4B		*Saptanmadı*	7	7	100,0
HU-1A	MIR604	*Saptandı*	5	5	100,0
HU-1B		*Saptanmadı*	4	5	**80,0**
HU-3A		*Saptandı*	5	5	100,0
HU-3B		*Saptanmadı*	4	5	**80,0**
HU-4A		*Saptandı*	4	5	**80,0**
HU-4B		*Saptanmadı*	3	5	**60,0**
HU-1A	GA21	*Saptanmadı*	2	2	100,0
HU-1B		*Saptanmadı*	2	2	100,0
HU-3A		*Saptanmadı*	2	2	100,0
HU-3B		*Saptanmadı*	2	2	100,0
HU-4A		*Saptanmadı*	2	2	100,0
HU-4B		*Saptanmadı*	2	2	100,0
HU-1A	3272	*Saptanmadı*	2	2	100,0
HU-1B		*Saptanmadı*	2	2	100,0
HU-3A		*Saptanmadı*	2	2	100,0
HU-3B		*Saptanmadı*	2	2	100,0
HU-4A		*Saptanmadı*	2	2	100,0
HU-4B		*Saptanmadı*	2	2	100,0
HU-1A	MIR162	*Saptanmadı*	2	2	100,0
HU-1B		*Saptanmadı*	2	2	100,0
HU-3A		*Saptanmadı*	2	2	100,0
HU-3B		*Saptanmadı*	2	2	100,0
HU-4A		*Saptanmadı*	2	2	100,0
HU-4B		*Saptanmadı*	2	2	100,0
HU-1A	DAS40278-9	*Saptanmadı*	5	5	100,0
HU-1B		*Saptanmadı*	5	5	100,0
HU-3A		*Saptanmadı*	5	5	100,0
HU-3B		*Saptanmadı*	5	5	100,0
HU-4A		*Saptanmadı*	5	5	100,0
HU-4B		*Saptanmadı*	5	5	100,0
HU-2A	MON87701	*Saptandı*	9	9	100,0
HU-2B		*Saptanmadı*	8	9	**88,9**
HU-3A		*Saptandı*	9	9	100,0
HU-3B		*Saptanmadı*	8	9	**88,9**
HU-4A		*Saptandı*	8	9	**88,9**
HU-4B		*Saptanmadı*	7	9	**77,8**
HU-2A	CV127	*Saptanmadı*	4	4	100,0
HU-2B		*Saptanmadı*	4	4	100,0
HU-3A		*Saptanmadı*	4	4	100,0
HU-3B		*Saptanmadı*	4	4	100,0

HU-4A		*Saptanmadı*	4	4	100,0
HU-4B		*Saptanmadı*	4	4	100,0
HU-2A	DP305423	*Saptanmadı*	4	4	100,0
HU-2B		*Saptanmadı*	4	4	100,0
HU-3A		*Saptanmadı*	4	4	100,0
HU-3B		*Saptanmadı*	4	4	100,0
HU-4A		*Saptanmadı*	4	4	100,0
HU-4B		*Saptanmadı*	4	4	100,0
HU-2A	MON87708	*Saptanmadı*	4	4	100,0
HU-2B		*Saptanmadı*	4	4	100,0
HU-3A		*Saptanmadı*	4	4	100,0
HU-3B		*Saptanmadı*	4	4	100,0
HU-4A		*Saptanmadı*	4	4	100,0
HU-4B		*Saptanmadı*	4	4	100,0
HU-2A	MON87769	*Saptanmadı*	4	4	100,0
HU-2B		*Saptanmadı*	4	4	100,0
HU-3A		*Saptanmadı*	4	4	100,0
HU-3B		*Saptanmadı*	4	4	100,0
HU-4A		*Saptanmadı*	4	4	100,0
HU-4B		*Saptanmadı*	4	4	100,0

4.3.4. Nicel Analiz Sonuçları

Laboratuvarların nicel analiz sonuçları Tablo 4.52, 4.53, ve 4.54'de özetlenmiştir. Burada hesaplanan z-skorlarının sonuçlarına ait grafikler Şekil 4.35, 4.36 ve 4.37'de verilmiştir. HU-1A için atanmış değer 1,107'dir. Tüm laboratuvarların z-skoru -2 ile 2 arasında olduğu ve analiz sonuçlarının z-skoru açısından uygun olduğu değerlendirilmiştir. HU-3A matrisinin MON87701 çeşidi için atanmış değer %1,666'dir ve matrisler ile ilgili nicel analiz raporlayan tüm laboratuvarların z skoru -2 ile 2 arasında kaldığından analiz sonuçları uygundur. HU-4A için laboratuvarlardan uygulanan yeterlilik testi kapsamında yalnızca nitel analiz istenmiştir. Buna karşın katılımcı laboratuvarların nicel analiz sonuçlarını iletmeleri nedeni ile %1,072 olan atanmış değere karşılık tüm laboratuvarların z-skoru sonucu -2 ile 2 arasında kaldığı ve analiz sonuçlarının uygun olduğu belirlenmiştir.

Tablo 4.52. HU-1A, HU-3A ve HU-4A numuneleri nicel sonuçları ve z-skorları

Laboratuvar Numarası	HU-1A		HU-3A		HU-4A	
	Hedef: MIR604		Hedef: MON87701		Hedef: MON87701	
	Atanmış değer: %1,107		Atanmış değer: %1,666		Atanmış değer: %1,072	
	Sonuç (%)	z-skoru	Sonuç (%)	z-skoru	Sonuç (%)	z-skoru
U-1						
U-2						
U-3	1,20	0,2	0,99	-1,0	0,77	-0,2
U-4						
U-5	1,23	0,3	2,17	0,5		
U-6			1,70	0,0	1,45	0,2
U-7						
U-8						
U-9	1,15	0,1	1,93	0,3	1,20	0,1
U-10	0,85	-0,6	1,53	-0,2	0,86	-0,2

**Bu çalışmada, yalnızca HU-1A ve HU-3A matrisinden nicel analiz sonucu istenmiştir.*

Nicel sonuç beklenen HU-1A ve HU-3A matrisleri ve nitel sonuç beklenen HU-4A matrisi için katılımcı sayısı, atanmış değerler ve yeterlilik testi için standart sapma değerleri Tablo 4.53'de verilmiştir. HU-4A matrisi için laboratuvarların nicel analiz sonuçlarını belirtmeleri üzerine bu verilerde Tablo 4.53'de gösterilmiştir.

Tablo 4.53. Atanmış Değerler ve Yeterlilik testi için standart sapma

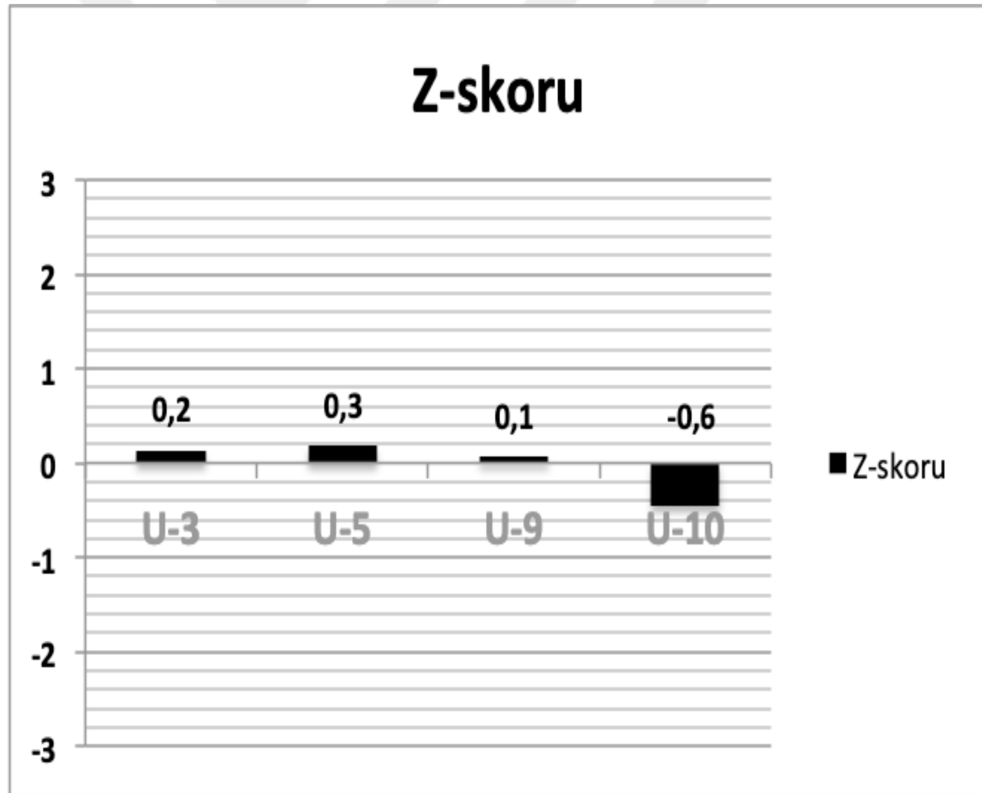
Numune	Analit	Katılımcı Sayısı	Atanmış Değer	Yeterlilik testi için standart sapma
HU-1A	MIR604	4	1,107	0,181
HU-3A	MON87701	5	1,666	0,228
HU-4A	MON87701	4	1,072	0,261

Katılımcı laboratuvarların z skorları Tablo 4.54'te gösterilmiştir. Sonuçlara göre tüm laboratuvarlarının z skorları 2 ve -2 değeri arasındadır.

Tablo 4.54. IzI≤2 Olan Z-skorlarının Sayısı ve Yüzdesi

Numune	Analit	IzI≤2 olan Katılımcı Sayısı	Atanmış Değer	%IzI≤2
HU-1A	MIR604	4	1,107	% 100
HU-3A	MON87701	5	1,666	% 100
HU-4A	MON87701	4	1,072	% 100

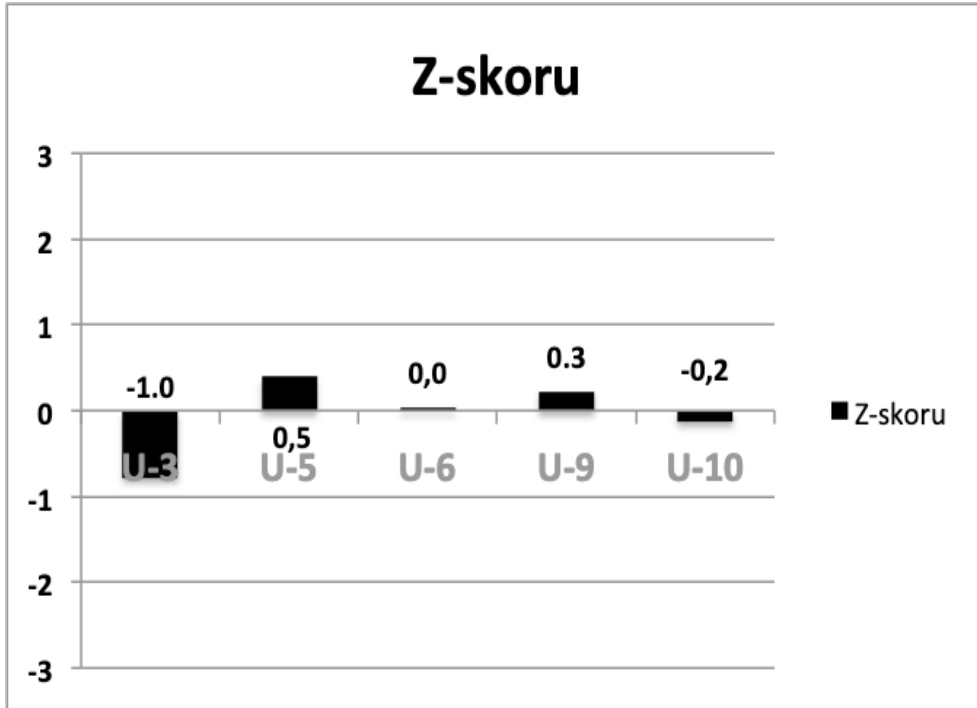
HU-1A matrisi için katılımcı laboratuvarların z-skorları Şekil 4.35'de verilmiştir.



z=2 değeri için 2,541 (w/w) z= -2 değeri için 0,482 (w/w) sınırdır.

Şekil 4.35. HU-1A için Z-skorları, MIR604

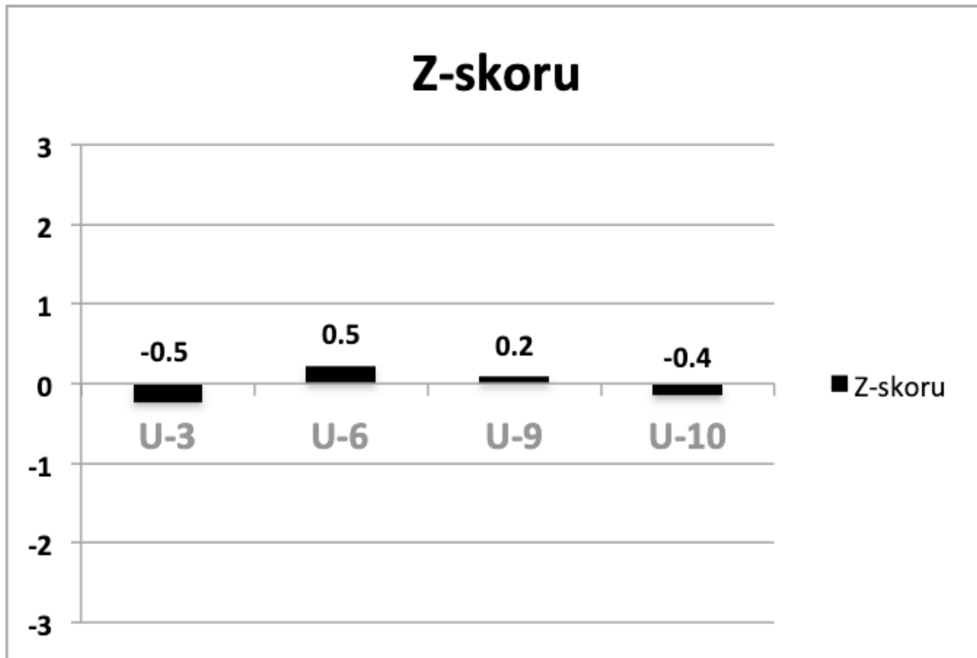
HU-3A matrisi için katılımcı laboratuvarların z-skorları Şekil 4.36'da verilmiştir.



z=2 değeri için 4,76 (w/w) z= -2 değeri için 0,583 (w/w) sınırdır.

Şekil 4.36. HU-3A için Z-skorları, MON87701

HU-4A matrisi için katılımcı laboratuvarların z-skoru Şekil 4.37'de verilmiştir.



z=2 değeri için 3,581 (w/w) z= -2 değeri için 0,32 (w/w) sınırdır.

Şekil 4.37. HU-4A için Z-skorları, MON87701

5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada, genetik modifiye organizma tespiti için yeterlilik test kiti geliştirilmiştir. Farklı içerikte matrislerde MON87701 soya ve MIR604 mısır çeşitlerini içerecek şekilde geliştirilen yeterlilik test kiti kullanılarak Türkiye'de GDO analizi yapan 8+2 (8 adet kamu gıda kontrol laboratuvarı ve 2 adet Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Araştırma Laboratuvarı) laboratuvar katılımı ile laboratuvarlar arası karşılaştırma çalışması düzenlenmiş ve TS ISO/IEC 17043 standardına uygun bir sistematik uygulanmıştır.

Bu çalışma, Türkiye'de TS EN ISO/IEC 17043 No'lu uluslararası standardı kapsamında YT/LAK kiti ile düzenlenen ilk laboratuvarlar arası ortak çalışma niteliğindedir. Laboratuvarlar arası metot birliği, standart sonuçların elde edilmesi ve GDO ile taklit ve tağşişin saptanması konusunda yoğun olarak karşılaşılan problemlerin aşılması hedeflenmiştir.

Bu çalışma ile YT/LAK testi geliştirilmesi ve uygulanması ile yeni bir süreç, sistem ve hizmet tesisi sağlanmıştır. Dolayısı ile bu çalışma ile yurt dışında üretilen ürün olan YT/LAK test materyali, YT/LAK test sağlama hizmeti, sistematiği ve bilgi birikimi ülke içerisinde üretilmesinin sürekliliği konusundaki ilk adım atılmıştır.

Ülkemizde YT/LAK test materyali geliştirilmesi ve yaygın kullanımının sağlanması ölçümlerin doğruluğu ve bu konuda yurtdışına bağımlılığını azaltması açısından önemlidir.

Diğer önemli bir nokta ise Türkiye'de GDO analiz laboratuvarı örnek kabul edip analiz yapabilmek için yaklaşık 50- 60 GDO çeşidini analiz ediyor olmalıdır. Bu durumda her GD çeşidi için en az yılda bir kez YT/LAK testine girmelidir. Bir çeşit için YT/LAK testi bedeli 700 Euro (4.417 TL + %18 KDV) olduğu düşünülürse her yıl yaklaşık 50 adet GDO analiz laboratuvarı en az 10 çeşit GDO için yeterlilik testine girmiş olsa yurt dışına 350.000 Euro (2.208.500 TL + %18 KDV) kadar laboratuvar gelirlerimizden gitmektedir. Üretilen yeterlilik test kiti uluslararası tedarikçiler ile karşılaştırıldığında matrislerin verifikasyonu ile başlayan ve rapor oluşturulmasına kadar geçen süreçte %75'lik bir oranda maliyet bakımından daha uygun bulunduğu hesaplanmıştır. Ulusal ve akredite bir YT/LAK materyalinin ve sistematiğinin geliştirilip, uygulanması bu tutarın ülke

içinde kalmasını sağlayacaktır. Ayrıca ulusal düzeyde ticari bir firmaya da YT/LAK testi sağlayıcısı niteliği kazandırılacaktır.

Bu çalışamada ilk aşama yeterlilik test kiti matrislerinin GD çeşit ve GD olmayan unların homojen karışımı sağlanarak oluşturulmasıdır.

İkinci aşama DNA ekstraksiyonu yönteminin optimize edilmesi aşamasıdır. Kit kullanılarak ekstrakte edilen DNA'lardan miktar ve kalite bakımından başarılı sonuçlar alınmıştır. Bu DNA'lardan değişim (varyasyon) katsayısı hesaplanıp literatür ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiş ve geçerliliği gösterilmiştir [99,100].

Üçüncü aşama tek laboratuvar GDO analizleri verifikasyonudur. Bu aşamada matrislerde kullanılan GD çeşitlerine spesifik primer prob dizileri, PCR şartlarının yürütüleceği parametreler, yanlış negatif oranı, yanlış pozitif oranı, inhibisyon testi, minimum tespit sınırı, doğruluk, tekrarlanabilirlik, minimum ölçüm sınırı, tekrar üretilebilirlik, laboratuvar sapma kontrolü, ölçüm belirsizliği gibi verifikasyon parametreleri ve son olarak stabilite testi yapılarak laboratuvarlar arası karşılaştırma testi öncesi analizler gerçekleştirilmiştir.

Dördüncü aşama laboratuvarlar arası karşılaştırma testidir. Katılımcı laboratuvarlardan istenen nitel, nicel analizler değerlendirilmiş ve sonuçlara göre laboratuvarların z-skorları hesaplanmıştır. Rapor ve değerlendirmeler tamamlandıktan sonra laboratuvarlara katılım sertifikaları iletilmiştir.

Çalışmanın ilgili aşamalarında alınan sonuçlar şu şekilde özetlenebilir;

1. DNA ekstraksiyonu inhibisyon testlerinde tahmin edilen değerlere karşı ölçülen değerlerin tümü 0.5 döngüden az olup lineer regresyonun R^2'si, tüm DNA örnekleri için > 0.99'dur. Elde edilen veriler, hazırlanan matrislerdeki mısır ve soya unlarına uygulanan ekstraksiyon yönteminin, sonraki RT-PCR bazlı tespit uygulamaları için uygun miktar ve kalitede DNA ürettiğini teyit etmektedir. Yüksek varyasyon katsayısı olan örnekler literatür sonuçları ile karşılaştırılıp benzer olduğu görülmüştür [90,91]. DNA ekstraksiyonu aşaması başarı ile gerçekleştirildikten sonra tek laboratuvar analizlerine geçilmiştir.

2. RT-PCR sonuçlarına göre RSDr değerleri referans materyallerde ve yeterlilik test kitindeki matrislerde %25'den az olduğu için uygundur. Doğruluk değerleri referans materyaller ve matrisler için %75-%125 arasında bulunduğu için uygundur.

3. HU-2A ve HU-4A matrislerinde dağıtım öncesi yapılan stabilite testi sonucu istatistiki olarak %25'lik doğruluk sınırının dışında kaldığı için laboratuvarlardan yalnızca nitel analiz sonucu istenmiştir. Yeterlilik test kiti matrislerinde örneklerden nitel ve nicel analiz istenmelerine göre bir çağrı mektubu hazırlanmıştır ve belirtilen süreler dahilindeki kayıtlar sonucu yeterlilik test kiti dağıtıma çıkmıştır.

4. Laboratuvarlararası karşılaştırma testinde laboratuvarların tarafımıza bildirimlerine göre U-1 laboratuvarı yoğunluktan dolayı sonuçlarını aktaramamıştır. U-6 laboratuvarı yeterlilik test kiti içerisinde kontrolü ile birlikte olan materyalleri (A ve B grupları) karıştırmış olup analizi istenen tüm kontrol gruplarında istenen GD çeşidinin elementleri (promotör, terminatör) ve GD çeşidini saptamıştır. U-6 laboratuvarının sonuçları laboratuvarımıza yaptıkları geri dönüşte belirtildiği gibi kendi içinde tutarlıdır ve nitel analizlerindeki olumsuzluklar bu kapsamda ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Ancak U-6 laboratuvarının bu çalışma sonuçları kendisi iletildiğinde sorunun kaynağını belirleyip çözmek üzere asıl ölçümlere yansımasının önüne geçmek amacıyla düzeltici ve önleyici faaliyet gerçekleştirmesi gerekmektedir.

5. Laboratuvarların tNOS terminatör genetik elementini içermeyen örneklerde yanlış pozitiflik saptamaları diğer önemli bir sonuçtur. Bu nedenle, gönderilen örnek ile toprak kökenli bir bakteri olan ve tNOS terminatörünün kaynağını oluşturan *Agrobacterium tumefaciens* ile katılımcı laboratuvar ortamında kontamine olduğu veya katılımcı laboratuvar personelinin çalışma esnasında bu genetik elementi içeren diğer yeterlilik test kiti matrisleri ile kontaminasyonundan kaynaklanabileceği yorumlanmıştır. Ancak katılımcı laboratuvarlarıdan tNOS elementi için yanlış pozitif sonuç alan laboratuvarların düzeltici ve önleyici faaliyette bulunması gereklidir.

6. Laboratuvarların FMV promotörünü içermediği bilinen matrislerde bu promotörü saptamaları yine analize alınan DNA'nın kontaminasyonu ile açıklanabilir. Ancak katılımcı laboratuvarların bu konuda düzeltici ve önleyici faaliyette bulunması önerilir.

7. Laboratuvarların p35S promotörünü içermediği bilinen matrislerde p35S promotörünü saptamalarının nedeni p35S promotörünün kaynağı karnabahar mozaik virüsü olduğundan dolayı ortamın bu virüsün genetik materyali ile

kontaminasyonu sonucu olabileceği değerlendirilmiştir. Laboratuvarların bu analiz için de düzeltici ve önleyici faaliyet düzenlemesi esastır.

8. HU-4A gibi ısıl işlem görmüş matrislerde beklenen tNOS terminatör genin bulunamaması öğütme sırasındaki ortam şartları, DNA ekstraksiyonu için öğütmenin yetersiz partikül çapı (verim düşüklüğü), yetersiz DNA konsantrasyonu, pipetleme esnasındaki DNA'nın homojen dağılmaması, ısıl işlem sonucu degrade olmuş DNA, personel ve DNA ekstraksiyon metodundan kaynaklanabilir. HU-4A örneğini analiz eden ve beklenen elementi bulamayan laboratuvarların sonuçları bakımından analiz aşamalarını geriye dönük değerlendirmesi ve düzeltici ve önleyici faaliyette bulunması esastır.

9. Yeterlilik test kitleri içn nicel analiz raporunu veren laboratuvarların z- skorları -2 ve +2 arasında bulunduğundan analiz sonuçları uygundur.

10. Laboratuvarlararası karşılaştırma testi sonrasında U-4 laboratuvarı "35S, NOS, FMV tarama analiziyle tespit edilemeyen ancak denetime tabi olan soya, pamuk ve mısır tipleri için yeterlilik testi bulamıyoruz. Düzenlediğiniz yeterlilik testinde ihtimal olarak verdiğiniz MON 87701 soya tipi dışında diğer tipleri de kapsayan yeterlilik testi yapılmasına uzun süredir ihtiyaç duyulmaktadır. En azından bu programınızla soya tipleri konusunda bu açığı kapatsak da ileriki programlarınız için soya, pamuk ve mısır tiplerini kapsayan tek bir matrisi planlamaya almanız birçok laboratuvarın ihtiyacını karşılayacaktır" şeklinde geri dönüşü, yeterlilik testinin doğru ve kesin analiz sonuçları için ne kadar önemli olduğunu, Türkiye'de GD analizi yapan laboratuvarların test bulunmayıp bu konuda adım atanların desteklenmesi gerektiğini ve bu testler olmadan laboratuvarın doğru ve kendinden emin sonuçlar veremeyeceğini özetlemektedir.

Sonuç olarak oluşturulan yeterlilik test kiti ile, literatüre uygun olarak tek laboratuvar GDO analizleri verifikasyonu ve laboratuvarlar arası karşılaştırma testi analizleri başarılı şekilde yürütülerek üretilen test kitinin validasyonu sağlanmıştır. Test sonuçları ve istatistiki analizler kapsamında oluşturulan yeterlilik test kiti yurt dışından getirilen testlere bir alternatif oluşturabilme kapasitesindedir.

Bu çalışmada yeterlilik testlerinde daha nadir yer verilen MON87701 ve MIR604 çeşidi için yeterlilik testi uygulanmıştır ve ileri çalışmalarda diğer GD çeşitleri

için de laboratuvarlar arası karşılaştırma ve yeterlilik testleri çalışmaları sürdürülmesi gerekliliğini ortaya koymuştur.



KAYNAKLAR

[1] Alper, M.P., ISO/IEC 17043 "Yeterlilik Testleri için Genel Şartlar" Standardına Uygun Olarak Karşılaştırma Ölçümlerinin Organizasyonu, **2013.**

[2] TSE, TS EN ISO/IEC 17025 "Deney ve Kalibrasyon Laboratuvarlarının Yeterliliği için Genel Şartlar", 2.Baskı, TURKAK, Ankara, **2010.**

[3] TSE, TS EN ISO/IEC 17043 "Yeterlilik Testleri için Genel Şartlar", 1. Baskı, TURKAK, Ankara, **2014.**

[4] ISO 13528 Uyarınca LAK/YT Çevrimlerinin İstatiksel Değerlendirmeleri, **2012.**

[5] ISO 13528 "Statistical Methods for Use in Proficiency Testing by Interlaboratory Comparison", 2nd Edition, Geneva, **2016.**

[6] EA, EA-2/18, Guidelines for Accreditation Bodies on the Contents of the Scopes of Accreditation for Proficiency Testing Providers, **2015.**

[7] ILAC, P13:10/2010 Application of ISO/IEC 17011 for the Accreditation of Proficiency Testing Providers, Australia, **2010.**

[8] TÜRKAK, R10.04, Uygunluk Değerlendirme Kuruluşlarının Akreditasyonu Rehberi, 12, **2018.**

[9] ISAAA, Pocket K No.1: Q and A About Genetically Modified Crops, http://www.isaaa.org/resources/publications/pocketk/1/, (**Erişim tarihi: 30 Nisan 2019**).

[10] WHO, Food Safety, https://www.who.int/foodsafety/areas_work/food-technology/faq-genetically-modified-food/en/ (**Erişim tarihi: 23 Şubat 2018**).

[11] USDA, Agricultural Biotechnology Glossary, https://www.usda.gov/topics/biotechnology/biotechnology-glossary (**Erişim tarihi: 30 Nisan 2018**).

[12] FDA, Consumer Info About Food from Genetically Engineered Plants, https://www.fda.gov/food/food-new-plant-varieties/consumer-info-about-food-genetically-engineered-plants (**Erişim tarihi: 30 Nisan 2019**).

[13] Çeltek, G., Genetik olarak modifiye edilmiş organizmalar (GMO), Gıda Mühendisliği Dergisi, 11-12, **2002.**

[14] Brooker R., Concepts of genetics, 1st Edition, Janice Roerig-Blong, New York, 476, **2012.**

[15] FA MENDELU, Çalışmayı uluslararası çalışmaya yönelik FA MENDELU öğretim programlarının yenilenmesi, http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/print.php?page=307&typ=html (Erişim tarihi: **14 Şubat 2019**).

[16] Potenza, C., Aleman, L. and Sengupta-Gopalan, C., Targeting transgene expression in research, agricultural and environmental applications: Promoters used in plant transformation, In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 40(1), 1-22, **2004.**

[17] Hemmer, W., Foods Derived from Genetically Modified Organisms and Detection Methods, Biosafety Research and Assessment of Technology Impacts of the Swiss Priority Program Biotechnology – Report 2/97, http://www.bats.ch/bats/publikationen/1997-2_gmo/index.php (Erişim tarihi: **10 Şubat 2019**).

[18] Beyer, P., Al Babili, S., Ye, X., Lucca, P., Schaub, P., Welsch, R. and Potrykus, I., Golden Rice: Introducing the beta-carotene biosynthesis pathway into rice endosperm by genetic engineering to defeat vitamin A deficiency, The Journal of Nutrition, 132(3), **2002.**

[19] Debode, F., Janssen, E. and Berben, G., Development of 10 new screening PCR assays for GMO detection targeting promoters (pFMV, pNOS, pSSuAra, pTA29, pUbi, pRice actin) and terminators(t35s, tE9, tOCS, tg7), European Food Research and Technology, 236(4), 659-669, **2013.**

[20] Gürakan, G.C., Aydın, G., Yılmaz, R., Qualitative detection of GM maize (Bt11) in food and feed sold commercially in Turkey by PCR based methods, Indian Journal of Biotechnology, *10*(January 2011), 143-146, **2016.**

[21] Rakoczy-trojanowska, M., Alternative methods of plant transformation- a short review, Volume 7, 849-858, **2002.**

[22] Rivera, A.L., Gomez-Lim, M., Fernandez, F., Loske, A.M., Physical methods for genetic plant transformation, Physics of Life Reviews, 9, 308-345, **2012.**

[23] Ziemienowicz, A., Agrobacterium-mediated plant transformation: Factors, applications and recent advances, Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 3(4), 95-102, **2014.**

[24] Gelvin, S.B., Agrobacterium-Mediated Plant Transformation: The Biology behind the “ Gene-Jockeying” Tool, Microbiology and Molecular Biology Reviews, 67(1), 16-37, **2003.**

[25] Davey, M.R., Anthony, P., Power, J.B. and Lowe, K.C., Plant protoplasts: Status and biotechnological perspectives, Biotechnology Advances, 23(2), 131-171, **2005.**

[26] Takebe, I., Otusuki, Y. and Aoki, S., Isolation of tobacco mesphyll cells in intact and active state, Plant and Cell Physiology, 9(1), 115-124, **1968.**

[27] Sinha, A., Wetten, A.C. and Caligari, P.D.S., Optimisation of Protoplast Production in White Lupin, Biologia Plantarum, 47(1), 21-25, **2003.**

[28] Sorokin, A.P., Ke, X.Y., Chen, D.F. and Elliott, M.C., Production of fertile transgenic wheat plants via tissue eletroporation, Plant Science, 156(2), 227-233, **2000.**

[29] Dovzhenko, A., Dal Bosco, C., Meurer, J. and Koop, H.U., Efficient regeneration from cotyledon protoplasts in Arabidopsis thaliana, Protoplasma, 222,(1-2), 107-11, **2003.**

[30] Holst-Jensen, A., Bertheau, Y., de Loose, M., Grohmann, L., Hamels, S., Houghs, L., Wulff, D., Detecting un-authorized genetically modified organisms(GMOs) and derived materials, Biotechnology Advances, 30(6), 1318-1335, **2012.**

[31] James, C., Brief 43- Global status of Commercialized biotech/GM Crops: 2011, International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications, (43), 36, **2011.**

[32] ENGL, Overview on the detection, interpretation and reporting on the presence of unauthorised genetically modified materials, JRC Scientific and Technical Reports, **2011.**

[33] Cankar, K., Chauvensy-Ancel, V., Fortabat, M. N., Gruden, K., Kobiilinsky, A., Zel, J. and Berheau, Y., Detection of nonauthorized genetically modified organisms using differential quantitative polymerase chain reaction: Application to 35S in maize, Analytical Biochemistry, 376(2), 189-199, **2008.**

[34] European Commission, GMOs: Eu decision-making process explained, **2015.**

[35] James, C., A global overview of biotech (GM) crops: Adoption, impact and future prospects, GM Crops, 1(1), 8-12, **2010.**

[36] Biosafety Clearing-House, Modified Organism SYN-IR604-5 Agrisure RW Rootworm-Protected maize, http://bch.cbd.int/database/record.shtml?documentid=15105 (Erişim tarihi: **25 Şubat 2019**).

[37] Biosafety Clearing-House, Modified Organism MON-87701-2- Insect resistant soybean,

http://bch.cbd.int/database/record.shtml?documentid=103079 (Erişim tarihi: **25 Şubat 2019**).

[38] Google Patents, Corn Event MIR604, https://patents.google.com/patent/US20120185973 (Erişim tarihi: **25 Şubat 2019**).

[39] Monsanto Japan Limited, Outline of the Biological Diversity Risk Assessment Report, http://www.biodic.go.jp/bch/download/en_lmo/H25.2.25_English1-2.pdf (Erişim tarihi: **25 Şubat 2019**).

[40] Phipps, R.H. and Park, J.R., Environmental Benefits of Genetically Modified Crops: Global and European Perspectives on Their Ability to Reduce Pesticide Use 2 Some concerns associated with conventional crop production, Journal Of Animal and Feed Sciences, 11(1), 1-18, **2002.**

[41] Aung, M.M. and Chang, Y.S., Traceability in a food supply chain: Safety and quality perspectives, Food Control, 39(1), 172-184, **2014.**

[42] Opera, L.O., Traceability in agriculture and food supply chain: A review of basic concepts, technological implications and future prospects, Food, Agriculture & Environment, 1(1), 101-106, **2003.**

[43] Miraglia, M., Berdal, K.G., Brera, C., Corbisier, P., Holst-Jensen, A., Kok, E.J. and Zagon, J., Detection and traceability of genetically modified organisms in the food production chain, Food and Chemical Toxicology, 42(7), 1157-1180, **2004.**

[44] Aarts, H.J.M., van Rie, J.P.P.F. and Kok, E.J., Traceability of genetically modified organisms, Expert Review of Molecular Diagnostics, 2(1), 69-76, **2002.**

[45] Gachet, E., Martin, G.G., Vigneau, F. and Meyer, G., Detection of genetically modified organisms (GMOs) by PCR: A brief review of methodologies available, Trends in Food Science and Technology, 9(11-12), 380-388, **1998.**

[46] ISAAA, GM Crop Events approved in Turkey, http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/approvedeventsin/default.asp?CountryID=TR&Country=Turkey (Erişim tarihi: **14 Şubat 2019**).

[47] ISAAA, Pocket K No. 16: Biotech Crop Highlights in 2017, http://www.isaaa.org/resources/publications/pocketk/16 (Erişim tarihi: **24 Şubat 2019**).

[48] ISAAA, Pocket K No. 16: Biotech Crop Highlights in 2017, http://www.isaaa.org/resources/publications/pocketk/16 (Erişim tarihi: **19 Şubat 2018**).

[49] Paoletti, C., Flamm, E., Yan, W., Meek, S., Renckens, S., Fellous, M. and Kuiper, H., GMO risk assessment around the World: Some examples, Trends in Food Science and Technology, 19(Suppl.1), 70-78, **2008.**

[50] Potenza, C., Aleman, L. and Sengupta-Gopalan, C., Targeting transgene expression in research, agricultural and environmental applications: Promoters used in plant transformation, In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 40(1), 1-22, **2004.**

[51] Yılmaz, R., Bayraç, C., Technical guidelines for the risk assessment of genetically engineering crops and derived food and feed. Ankara, **2017**.

[52] Mazzara, M., Paoletti, C., Corbisier, P., Grazioli, E., Larcher, S.i Berben, G. and Van den Eede, G., Kernel Lot Distribution Assessment (KeLDA): a Comparative Study of Protein and DNA-Based Detection Methods for GMO Testing, Food Analytical Methods, 6(1), 210-220, **2012.**

[53] Pasternak, J.J., Glick, B.R. and Patten, C.L. (Eds.), Molecular Biotechnology, American Society of Microbiology, **2010.**

[54] Frieden, E., Non-Covalent Interactions: Key to biological flexibility and specificity, Journal of Chemical Education, 52(12), 754-761, **1975.**

[55] Mendoza, L.G., McQuary, P., Mongan, A., Gangadharan, R., Brignac, S. and Eggers, M., High-troughput microarray-based enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA), BioTechniques, 27(4), 778-780, 782-786, 788, **1999.**

[56] Tobe, V.O., Taylor, S.L. and Nickerson, D.A., Single-well genotyping of diallelic sequence variations by a two-color ELISA-based oligonucleotide ligation assay, Nucleic Acids Research, 24(19), 3726-3732, **1996.**

[57] GMO Testing, ELISA, http://www.gmotesting.com/Testing-Options/Immuno-analysis/ELISA (Erişim tarihi: **14 Şubat 2019**).

[58] Chalam, V.C. and Khetarpal, R.K., ELISA-based Detection of GMOs, http://www.envfor.nic.in/divisions/csurv/biosafety/Gef2/T5/12%20Dr.%20 Celia_ELISA%20based%20detection%20of%20LMOs.pdf (Erişim tarihi: **10 Ocak 2019**).

[59] WHO/EU JRC, Gıda Örneklerinde Genetiği Değiştirilmiş Organizma Analizleri: Kurs Elkitabı, Querci, M., Jermini, M. ve Van den Eede, G. (Eds.), (Çev: Yılmaz, R., Eyidoğan, F., Öz, M.T., Yücel, M., Öktem, H.A.), **2009.**

[60] Genetic Science Learning Center, University of Utah, http://gslc.utah.edu (Erişim tarihi: **14 Şubat 2019**).

[61] Anonim, Extract DNA from cells, https://www.biologyjunction.com/extracting_dna.htm (Erişim tarihi: **14 Şubat 2019**).

[62] Anonim, Fundamentals of Genetic Engineering, http://slideplayer.com/slide/10472532/ (Erişim tarihi: **14 Şubat 2019**).

[63] Leimanis, S., Hernandez, M., Fernandez, S., Boyer, F., Burns, M., Bruderer, S., Remacle, J., A microarray-based detection system for genetically modified (GM) food ingredients, Plant Molecular Biology, 61(1-2), 123-139, **2006.**

[64] Siqueira, J.F. and Roças I.N., PCR methodology as a valuable tool for identification of endodontic pathogens, Journal of Dentistry, 31(5), 333-339, **2003.**

[65] Cline, J., Braman, J.C. and Hogrefe, H.H., PCR fidelity of pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases, Nucleic Acids Research, 24(18), 3546-3551, **1996.**

[66] Logan, J.M.J., Edwards, K.J. and Saunders, N.A., Real-time PCR: Current Technology and Applications, Caister Academic Press, **2009.**

[67] Ahmed, F.E., Detection of genetically modified organisms in foods, Trends in Biotechnology 20(5), 215-223, **2002.**

[68] Holst-Jensen, A., Ronning, S.B., Lovseth, A. And Berdal, K.G., PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs), Analytical and Bioanalytical Chemistry, 375(8), 985-993, **2003.**

[69] Navarro, E., Serrano-Heras, G., Castano, M.J. and Solera J., Real-time PCR detection chemistry, Clinica Chimica Acta, 439, 231-250, **2015.**

[70] De Ley, J., Cattoir, H. and Reynaerts, A., The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates, European Journal of Biochemistry, 12(1), 133-142, **1970.**

[71] Roche, Lightcycler 96 Real-time PCR System, https://lifescience.roche.com/documents/LightCycler-96-Real-Time-PCR-System-Super-Capabilities-Are-Now-Within-Your-Reach.pdf (**Erişim tarihi: 24 Şubat 2019**).

[72] Sigma-Aldrich, Primers and Fluorescent Probes for Real-Time PCR and Other Applications, https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Brochure/fluorescent_dna_probes.pdf (Erişim tarihi: **24 Şubat 2019**).

[73] Trapmann, S., Corbisier, P., Schimmel, H. and Emons, H., Towards future reference systems for GM analysis, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 396(6), 1969-1975, **2010.**

[74] Trapmann, S., Schimmel, H., Kramer, G.N., Van den Eede, G. and Pauwels, J., Production of certified reference materials for the detection of genetically modified organisms, Journal of Aoac International, 85, 775-779, **2002.**

[75] EU Science Hub, Reference Materials for GMO Analysis, https://ec.europa.eu/jrc/en/research-topic/reference-materials-gmo-analysis (Erişim tarihi: **14 Şubat 2019**).

[76] Chaouachi, M., Berard, A. and Said, K., Relative quantification in seed GMO analysis: State of art and bottlenecks, Transgenic Research, 22(3), 461-476, **2013.**

[77] Trapmann, S., Burns, M., Broll, H., MacArthur, R., Wood, R.K.S., Zel, J., Guidance document on measurement uncertainty for GMO testing laboratories, JRC Scientific and Technical Reports, **2009.**

[78] Spiegelhalter, F., Lauter, F.R. and Russel, J.M.J., Food Science, 66, 634-640, **2001.**

[79] Menditto, A., Patriarca, M. and Magnusson, B., Understanding the meaning of accuracy, trueness and precision, Accreditation and Quality Assurance, 12(1), 45-47, **2007.**

[80] ENGL, Definition of Minimum Performance Requirements for Analytical Methods of GMO Testing, 1-8, **2008.**

[81] EMA, ICH Topic Q2 (R1), Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, 1-15, **2006.**

[82] AOAC, Guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals, 1-38, **2002.**

[83] Corbisier, P., Trapmann, S., Gancberg, D., Hannes, L., Van Iwardeen, P., Berben, G., Schimmel, H. and Emons, H., Quantitative determination of Roundup Ready soybean (Glycine max) extracted from highly processed flour, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 383, 282-290, **2005.**

[84] Papazova, N., Zhang, D., Gruden, K., Vojvoda, J., Yang, L., Gasparic, M.B., Taverniers, I., Evaluation of the reliability of maize reference assays for GMO quantification, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 396(6), 2189-2201, **2010.**

[85] Moreano, F., Busch, U., Engel, K.H., Distortion of genetically modified organism quantification in processed foods: influence of particle size

compositions and heat-induced DNA degredation, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 28, 9971-9979, **2005.**

[86] FAPAS, GM (GeMMA) Proficiency Testing Programme, https://fapas.com/shop/search?producttypes=1 (Erişim tarihi: **24 Şubat 2019**).

[87] European Commission, Guidelines for sample preperation procedures in GMO analysis, JRC Technical Report, Ispra, **2014.**

[88] Yilmaz, R., Bayraç, C. & Yücel, M. Single laboratory method performance evaluation for the analysis of Roundup Ready® soy flour by qualitative and quantitative detection methods, Quality Assurance and Safety of Crops & Foods, *9*(3), 303-311, **2017.**

[89] ENGL, Verification of analytical methods for GMO testing when implementing interlaboratory validated methods, JRC Technical Report, Ispra, **2017.**

[90] TÜRKAK, P704 Yeterlilik Deneyleri ve Laboratuvarlar Arası Karşılaştırma Programları Prosedürü, Revizyon No:6, Ankara, **2016.**

[91] FAPAS, Protocol for Proficiency Testing Schemes Part 1 – Common Principles, Version 6, **2007.**

[92] LGC Standards, General Protocol for Proficiency Testing Schemes, Baskı:7, **2014.**

[93] Broothaerts, W., Beaz Hidalgo, R., Corbisier, P., Cordeiro, F., Dimitrievska, B., Emteborg, H., Maretti, M., Robouch, P., Emons, H., Determination of GM Soybean 40-3-2 in Chicken Feed and Soybean Flour, JRC Technical Reports, Luxembourg, **2017.**

[94] Powell, J. and Owen, L., Reliability of Food Measurements: The Application of Proficiency Testing to GMO Analysis, Accreditation and Quality Assurance, 7, 392-402, **2002.**

[95] Analytical Methods Committee, GMO Proficiency Testing: Interpreting z-scores derived from log-transformed data, RSC, AMC Technical Brief, No.18, **2004.**

[96] Thompson, M., Ellison, S.L., Owen, L., Mathieson, K., Powell, J., Key, P., Wood, R., Damant, A.P., Scoring in GMO Proficiency Tests based on log-transformed results, Journal of AOAC International, 89(**1),** 232-239, **2006.**

[97] Eurochem, Selection, Use and Interpretation of Proficiency Testing (PT) Schemes, Ian Mann and Brian Brookman (Eds.), EEE-PT WG, Second Edition, **2011.**

[98] Thermo Scientific, T042- Technical Bulletin NanoDrop Spectrophotometers (260/280 and 260/230 ratios), http://www.nhm.ac.uk/content/dam/nhmwww/our-science/dpts-facilities-staff/Coreresearchlabs/nanodrop.pdf (Erişim tarihi: **17 Şubat 2019**).

[99] European Commission, Report on the Validatiton of a DNA Extraction Method from Maize Seeds, JRC Technical Report, **2007.**

[100] European Commission, Report on the Validatiton of a DNA Extraction Method for Soybean Seeds", JRC Technical Report, **2017**



EKLER

EK-A

Ölçüm Belirsizliği Hesaplama Yolu

Tek laboratuvar tekrar üretilebilirlik

Denklem 1

c_i: 2 analitik sonucun ortalaması

$$c_i = \frac{c_{i,1} + c_{i,2}}{2}$$

Denklem 2

d_i : 2 analiz sonucu arasındaki mutlak fark

$$d_i = \left| c_{i,1} - c_{i,2} \right|$$

Denklem 3

rad_i: Analizler arasındaki bağıl fark

$$rad_i = \frac{d_i}{c_i} \text{x} 100$$

Denklem 4

RSD_R (S_r) : Tek laboratuvar analizleri tekrar üretilebilirlik standart sapması

$\bar{d}$: Ortalama fark

d_n : Ölçülen analit miktarına göre değişken

$$S_r = \frac{\bar{d}}{d_n}$$

Denklem 5

RSD_r : Tek laboratuvar analizleri bağıl standart sapma

$\overline{rad}$: Ortalama bağıl fark

$$RSD_r = \frac{\overline{rad}}{d_n}$$

Method ve Laboratuvar Sapma Kontrolü

Denklem 6

Δ_m: Ölçülen ortalama değer ve sertifika değeri mutlak farkı

c_m: Ölçülen ortalama değer

c_{CRM}: Sertifika değeri

$$\Delta_m = |c_m - c_{CRM}|$$

Denklem 7

u_Δ : Sertifikalı değer ve ölçüm belirsizliğinin birleştirilmesi

u_{m} : Ölçülen sonucun ölçüm belirsizliği

u_{CRM} : Sertifikalı değerin ölçüm belirsizliği

$$u_\Delta = \sqrt{u_m^2 + u_{CRM}^2}$$

Denklem 8

u_{m} : Ölçülen sonucun ölçüm belirsizliği

n : Bağımsız analiz sonuçları

$$u_{\mathrm{m}} = \frac{S_r}{\sqrt{n}}$$

Denklem 9

Genişletilmiş belirsizlik U_Δ , %95'lik güven aralığına denk gelir ve u_Δ'nin kapsam faktörü k=2 ile çarpımından elde edilir.

U_Δ : sonuç ve sertifikalı değer arasındaki farkın genişletilmiş belirsizliği

$$U_\Delta = u_\Delta \,\mathrm{x}\, 2$$

Değerlendirme:

Eğer $\Delta_m \leq U_\Delta$ ölçülen değer ve sertifikalı değer arasındaki fark arasında önemli bir fark yoktur. Bu olay sapma yoktur olarak yorumlanır.

Sapma ile ilgili belirsizlik bileşenlerinin tahmini

Denklem 10

$$u_{biasr} = \sqrt{\frac{RSD_R^2}{n} + \left(\frac{u_{CRM}}{c_{CRM}} \mathrm{x}100\right)^2}$$

Denklem 11

RSU : Bağıl standart belirsizlik

$$RSU = \sqrt{RSD_R^2 + u_{biasr}^2}$$

Ölçüm belirsizliğinin değerlendirilmesi

Denklem 12

u : Ölçüm belirsizliği

u_0 : Mutlak standart belirsizlik

c : Ölçüm sonucu

$$u = \sqrt{u_0^2 + (c \times RSU)^2}$$

z-skoru Hesaplaması

Denklem 13

μ : Rapor edilen sonuç

X: Atanmış değer

σ : Standart sapma için hedef değer

$$z = \frac{X - \mu}{\sigma}$$

EK-B

Laboratuvarlara Gönderilen Davet Mektubu



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Mühendislik Fakültesi
Gıda Mühendisliği Bölümü

01/11/2018

Sayın Yetkili,

GDO analizleri için dış kalite kontrol unsuru olan laboratuvarlar arası karşılaştırma ve yeterlilik testleri genellikle yurtdışından sağlanmaktadır. Gıda ve yem ürünlerinde GDO tespitinin yeterli ve doğru ölçümü için laboratuvarlar arası karşılaştırma ve yeterlilik testleri oldukça önemlidir ve hem ulusal hem uluslararası ölçekte yapılan GDO tip ve miktar analizlerinin kabul görmesi adına bu testlerden iyi sonuç almak gerekliliktir.

Bu çalışmada, gıda ve yem ürünleri için GDO Yeterlilik Test Kiti sertifikalı referans materyale dayalı olarak hazırlanmıştır ve içeriğindeki matrisler aşağıdaki gibidir:

- ✓ Tek Çeşit İşlenmemiş Matris (soya ve mısır unu)
- ✓ Karışık Çeşit İşlenmemiş Matris (soya ve mısır unu)
- ✓ Karışık Çeşit İşlenmiş Matris (Bisküvi)

Katılımcı laboratuvarlardan bu çalışma kapsamında GDO tespiti için üretilen **Gıda ve Yem Ürünlerinde GDO Yeterlilik Test Kiti** ile laboratuvarların kendi prosedürleri kullanılarak eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile nitel ve nicel analizler gerçekleştirilmesi beklenmektedir.

Analiz süresince takip edilen prosedür EK1'de verilen bilgiler doğrultusunda test sonuçları ile birlikte iletilmelidir. Test seti laboratuvara ulaştığı zaman **+4** ile -**20°C** arasında saklanması önerilmektedir. Analizden sonra ise, katılımcıların her örnek için eşik döngü değerleri ve RT-PCR'ın verimliği (PCR efficiency) değerlerinin tarafımıza iletilmesi gerekmektedir (EK2).

Bu çalışmaya katılacağını bildiren laboratuvarlara **12-16 Kasım 2018** tarihinde örneklerin gönderilmesi planlanmaktadır. Analiz raporlarının ve deneyle ilgili istenilen sonuçların gönderilmesi için örneklerin laboratuvara ulaşmasından itibaren katılımcının **3 hafta süresi** olacaktır.

Hacettepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nce üretilen **Gıda ve Yem Örnekleri için GDO Yeterlilik Test Kiti** katılımcı laboratuvarlara dağıtım süreç maliyeti tarafımızca karşılanacaktır.

Katılımcı laboratuvar kitin kendilerine ulaşmasından itibaren üç hafta içerisinde elde ettiği sonuçları ekli formlar kullanılarak remziye@hacettepe.edu.tr adresine iletmelidir. Sonuçlar her laboratuvara ait kod numarası ile anonim olarak saklanacak ve sadece projede yer alan öğretim üyeleri ile katılımcı laboratuvarlar arasında tartışılacaktır. Bu çalışma sonuçları katılımcıların tüm hakları saklı kalmak koşulu ile yayınlanabilir.

Katılımcı laboratuvarlara test sonucunu içeren "**Katılım Sertifikası**" verilecektir.

Birlikte gerçekleştireceğimiz bu çalışma için sağlayacağınız katkı tüm taraflar ve ülke ekonomisi açısından çok önemli yer tutacaktır. Ayıracağınız zaman ve emek için teşekkür ederiz.

Saygılarımla,

Doç. Dr. Remziye YILMAZ
Proje Yürütücüsü

Hacettepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü 06800 Beytepe Ankara
Telefon: (+90312) 2977110, Faks: (+90312) 2992123, web: http://www.food.hacettepe.edu.tr



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Mühendislik Fakültesi
Gıda Mühendisliği Bölümü

Gıda ve Yem Ürünlerinde GDO Yeterlilik Test Kiti

Tek Çeşit İşlenmemiş Matris
Yeterlilik testinin bu kategorisi işlenmemiş matrislerden oluşmaktadır. Matrisler tek tip un içermektedir. Tablo 1'de belirtilen ürün kodlarında mısır ve soya çeşidi için nitel ve mısırın ilgili çeşidi için nicel analiz istenmektedir.

Tablo 1. Tek çeşit işlenmemiş matris

Sevkiyat Tarihi	Ürünün Kodu	Matriks	Analitler	Yaklaşık boyut (g)
	HU-1	%100 Mısır Unu	Mısır Potansiyel GDO Çeşitleri	2
	HU-2	%100 Soya Unu	Soya Potansiyel GDO Çeşitleri	2

Karışık Çeşit İşlenmemiş Matris
Yeterlilik testinin bu kategorisi işlenmemiş matristen oluşmaktadır. Matris karışık un (soya ve mısır) içermektedir. Tablo 2'de belirtilen ürün kodunda mısır ve ilgili çeşidi için **nitel soya** ve ilgili çeşidi için **nicel** analiz istenmektedir.

Tablo 2. Karışık Çeşit İşlenmemiş Matris

Sevkiyat Tarihi	Ürünün Kodu	Matriks	Analitler	Yaklaşık boyut (g)
	HU-3	Karışık Un	Mısır ve Soya Potansiyel GDO Çeşitleri	2

Karışık Çeşit İşlenmiş Matris
Yeterlilik testinin bu kategorisi işlenmiş matristen oluşmaktadır. İşlenmiş matrisin içerdiği karışık un (soya ve mısır) ısıl işlemden geçmiştir (bisküvi). Tablo 3'de belirtilen ürün kodunda nitel analiz istenmektedir.

Tablo3. Karışık çeşit işlenmiş matris

Sevkiyat Tarihi	Ürünün Kodu	Matriks	Analitler	**Yaklaşık boyut** (adet)
	HU-4	Bisküvi	Mısır ve Soya Potansiyel GDO Çeşitleri	4

Potansiyel GDO çeşitleri **Tablo 4** ve **Tablo 5**'de verilmiştir.

Tablo 4. Potansiyel GDO Çeşitleri (Mısır listesi)

Bt11 mısır	MON810 mısır	TC1507 mısır	MON88017 mısır
Bt176 mısır	GA21 mısır	MON863 mısır	Diğer GDO Çeşitleri
NK603 mısır	MIR604 mısır	MON89034 mısır	

Tablo 5. Potansiyel GDO Çeşitleri (Soya listesi)

Roundup Ready®(40-3-2) soya	MON89788 soya	MON87701 soya	Diğer GDO Çeşitleri

Hacettepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü 06800 Beytepe Ankara
Telefon: (+90312) 2977110, Faks: (+90312) 2992123, web: http://www.food.hacettepe.edu.tr

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Mühendislik Fakültesi
Gıda Mühendisliği Bölümü

EK-1
Katılımcıların Tarafımıza İletmesi Gereken
Gıda ve Yem Ürünlerinde GDO Tespiti Yeterlilik Test Kiti ile Takip Edilen Analiz Prosedürü

1. Laboratuvarın Tespit Limiti (LOD):

2. PCR karışımı hazırlama tablosu:

Karışım içeriği	Tüp başına düşen hacim
Mix	
Primer 1	
Primer 2	
Probe	
PCR gradient H_2O	
DNA örneği	
Toplam hacim	

3. RT-PCR aşamaları:

	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı (cycle number)	Hızlanma oranı (Ramp rate)*	Veri alma modu (Acquisition mode)
Ön-inkübasyon					
Kuantifikasyon					
Soğutma					

* En düşük hızlanma oranını (ramp rate) seçiniz.

4. RT-PCR cihazınızla ilgili bilgi veriniz (marka, model vb.):

Hacettepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü 06800 Beytepe Ankara
Telefon: (+90312) 2977110, Faks: (+90312) 2992123, web: http://www.food.hacettepe.edu.tr



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Mühendislik Fakültesi
Gıda Mühendisliği Bölümü

EK-2
Katılımcıların Tarafımıza İletmesi Gereken Analiz Sonuçları

1. Lütfen aşağıdaki tabloları doldurunuz

1.1. DNA izolasyon Sonuçları

Örnek Adı	Konsantrasyon (ng/mL)			Ratio ($A_{260/280}$)		
	Tekrar 1	Tekrar 2	Tekrar 3	Tekrar 1	Tekrar 2	Tekrar 3
HU-1						
HU-2						
HU-3						
HU-4						

1.2. Nitel Analiz (Var/Yok Testi) :

Örnek Adı	Ct (eşik döngü değeri)		
	Tekrar 1	Tekrar 2	Tekrar 3
HU-1			
HU-2			
HU-3			
HU-4			

1.3. Nicel Analiz (Miktar Tayini) :

Örnek Adı	Hedef Bölge (Ct ve Kopya sayısı)			Referans Bölge (Ct ve Kopya sayısı)			% GM oranı
	Tekrar 1	Tekrar 2	Tekrar 3	Tekrar 1	Tekrar 2	Tekrar 3	
HU-1							
HU-3							

2. Lütfen eşik döngü değerlerine (Ct value) ait analiz sonuçlarının ekran görüntülerini de rapora ekleyiniz (Lütfen eşik döngü değerlerine ait ekran görüntülerinde örnek adının ve amplifikasyon eğrisine ait ekran görüntülerinde örnek adının ve diğer parametrelerin göründüğünden emin olunuz).

EK-C

Sertifika Örneği



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ MÜHENDİSLİK FAKÜLTESİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ BÖLÜMÜ

GIDA VE YEM ÜRÜNLERİNDE GDO YETERLİLİK TESTİ
KATILIM SERTİFİKASI
Kasım-Aralık 2018

U Numarası GIDA KONTROL LABORATUVARI

GIDA VE YEM ÜRÜNLERİNDE GDO YETERLİLİK TESTİ'NE KATILMIŞTIR. *

Prof. Dr. Halil VURAL
Bölüm Başkanı

Doç. Dr. Remziye YILMAZ
Öğretim Üyesi

*Yeterlilik testi sonuç raporu tarafınıza posta yolu ile gönderilmiştir.



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS/~~DOKTORA~~ TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 12/09/2019

Tez Başlığı / Konusu: GIDA VE YEM ÜRÜNLERİNDE GDO TESPİTİ İÇİN YETERLİLİK TEST KİTİ GELİŞTİRİLMESİ

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 168 sayfalık kısmına ilişkin, 12/09/2019 tarihinde ~~şahsım~~/tez danışmanım tarafından *Turnitin* adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 6 'dır.

Uygulanan filtrelemeler:
1- Kaynakça hariç
2- Alıntılar hariç/~~dâhil~~
3- 5 kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orjinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

12.09.2019

Gereğini saygılarımla arz ederim.

Tarih ve İmza

Adı Soyadı:	TAHA TURGUT ÜNAL
Öğrenci No:	N16128465
Anabilim Dalı:	Gıda Mühendisliği
Programı:	Yüksek Lisans
Statüsü:	☒ Y.Lisans ☐ Doktora ☐ Bütünleşik Dr.

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.

Doç. Dr. Remziye YILMAZ
(Unvan, Ad Soyad, İmza)

CV

Adı Soyadı: Taha Turgut Ünal

Doğum Tarihi: 18.03.1993

Ünvanı: Yüksek Lisans Öğrenci

Eğitim

- ✓ 1999-2011 TED Karabük Koleji
- ✓ 2011-2016 Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Lisans
- ✓ 2016-2019 Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Yüksek Lisans

Yüksek Lisans Tezi

- ✓ Gıda ve Yem Ürünlerinde GDO Tespiti için Yeterlilik Test Kiti Geliştirilmesi

Projeler

- ✓ Şeker Pancarı ve Şekerden İzomalt Eldesi Fizibilite Raporu (Prof. Dr. İsmail Hakkı BOYACI) **2015**
- ✓ Toz Ayran Projesi (Prof. Dr. İsmail Hakkı BOYACI) **2016**
- ✓ İklim Değişikliği ve Gıda Güvencesi Hakkında Farkındalığın Ölçümü ve Geliştirilmesi (Doç. Dr. Remziye YILMAZ) **2017**
- ✓ Konuk Bilim İnsanı Projesi (Hacettepe Üniversitesi-Michigan State University) **2017**
- ✓ Mevlana projesi GDO Risk değerlendirmesinde omik teknolojilerin kullanım imkanları, Michigan State Üniversitesi, ABD, **2019**
- ✓ Erasmus, Michigan State Üniversitesi, ABD, **2019**

Staj Deneyimleri

- ✓ Oylum Süt Ürünleri Fabrikası **2014**
- ✓ Luket Et Fabrikası **2015**

İş Deneyimleri

- ✓ Golden Age Hotel Yalıkavak Bodrum **2017**

Önemli Katılım Belgeleri

- ✓ FAO – Regional biosafety training course on GM Risk analysis, monitoring and inspections
- ✓ ALTIGEN – Gıda güvenliğinde q-PCR tekniğinin kullanım olanakları
- ✓ Gıda Mühendisliği 8. Öğrenci Kongresi

İlgi Alanları

- ✓ MatLab
- ✓ Phyton
- ✓ C
- ✓ C#
- ✓ Yabancı Dil